

# **Kinetik zirkulierender microRNAs als Antwort auf kardialen Stress bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Lisa Schäfer**

aus Binningen/Schweiz

2019

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Felix Jansen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Daniela Wenzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.06.2019

Aus der Medizinischen Klinik II - Innere Medizin (Kardiologie, Pneumologie)

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	8
1.1 Koronare Herzkrankheit .....	8
1.1.1 Epidemiologie.....	8
1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie .....	8
1.1.3 Die chronische koronare Herzkrankheit.....	10
1.2 MicroRNA.....	12
1.2.1 MiRNA-Kinetik bei koronarer Ischämie .....	14
1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Laborgeräte.....	19
2.1.2 Allgemeines .....	19
2.1.3 Reagenzien .....	20
2.1.4 Kits und Mastermix.....	20
2.1.5 Real-Time PCR Primer.....	20
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Patientenkollektiv und Rekrutierung .....	21
2.2.2 Dobutamin-Stressechokardiographie Protokoll.....	21
2.2.3 Koronarangiographie .....	22
2.2.4 Probengewinnung .....	22
2.2.5 MiRNA-Quantifizierung im Plasma .....	23
2.2.6 Statistische Analyse .....	30
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Baseline-Charakteristika .....	32
3.2 Zirkulierende miRNAs als Antwort auf kardialen Stress.....	36

3.3 Stratifizierung der zirkulierenden miRNAs in Bezug auf das Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose .....	39
4. Diskussion.....	42
4.1 Diskussion der Hauptergebnisse.....	42
4.2 Limitationen der Studie.....	46
4.3 Ausblick.....	47
5. Zusammenfassung.....	49
6. Abbildungsverzeichnis.....	50
7. Tabellenverzeichnis .....	51
8. Literaturverzeichnis .....	52
9. Danksagung.....	60

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
LDL	low density lipoprotein
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
pri-miRNA	primary microRNA
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ssDNA	einzelsträngige DNA (single-stranded DNA)

## 1. Einleitung

### 1.1 Koronare Herzkrankheit

#### 1.1.1 Epidemiologie

Die koronare Herzkrankheit gehört nach wie vor zu den bedeutendsten Volkskrankheiten in den Industrienationen. Laut statistischem Bundesamt waren 38,5 % aller Todesfälle im Jahr 2015 auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017). Die koronare Herzkrankheit stellt dabei die häufigste Erscheinungsform der Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar und ist mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden (Hamm et al., 2011). Obwohl die Neuerkrankungsrate und die Sterblichkeit seit einigen Jahrzehnten kontinuierlich sinken, führten die chronische koronare Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt, als klinische Ausprägungen der koronaren Herzkrankheit, weiterhin die Todesursachenstatistik mit 76.013, beziehungsweise 49.210 Verstorbenen im Jahr 2015 an (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017; Busch und Kuhnert, 2017; Gemeinsam getragen von RKI und Destatis, 2015). Die Lebenszeitprävalenz der koronaren Herzkrankheit bei Männern wurde in Deutschland auf 9,6 % geschätzt. Frauen erkranken mit einer Lebenszeitprävalenz von 6,6 % seltener (Gemeinsam getragen von RKI und Destatis, 2015).

#### 1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Bei der koronaren Herzkrankheit handelt es sich um die klinisch relevante Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien (Ross, 1986). Atherosklerose ist ein fokaler krankhafter Zustand der arteriellen Gefäßwand, verursacht durch eine Lipid-induzierte Entzündungsreaktion (Wei et al., 2013). Sie entsteht hauptsächlich an Stellen mit gestörtem laminarem Blutfluss, insbesondere an Bifurkationen, Gefäßabgängen und Biegungen, wo niedrige oder oszillierende Scherspannung vorherrscht (Loyer et al., 2014). An der Pathogenese ist eine Vielzahl an Zellen, wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen, beteiligt.

Eine zentrale Rolle in der Entstehung der Atherosklerose spielen dysfunktionale Endothelzellen, die sich unter anderem durch eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation, eine erhöhte Permeabilität und die Expression von Chemokinen und



Adhäsionsmolekülen auszeichnen, sowie eine verminderte Endothelzellregeneration (Wei et al., 2013). Endothelzellen bilden die innerste Gefäßzellschicht und können durch oxidativen Stress, wie er zum Beispiel bei arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus vorkommt, geschädigt werden (Cai und Harrison, 2000). Die erhöhte Endothelzellpermeabilität begünstigt die subendotheliale Ansammlung von low-density Lipoproteinen (LDL), was eine Aktivierung der Endothelzellen zur Folge hat. Diese wird durch modifiziertes, oxidiertes LDL noch zusätzlich verstärkt. Die aktivierten Endothelzellen sezernieren daraufhin Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die Entzündungszellen, wie zum Beispiel Monozyten, anlocken und einen Eintritt dieser Zellen in den subendothelialen Raum ermöglichen. Die Mehrheit der eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen, die die subendothelialen Lipoproteine aufnehmen und durch die massive Fettspeicherung zu Schaumzellen transformieren (Moore und Tabas, 2011). Die Ansammlung von Schaumzellen und T-Lymphozyten in der Arterienwand wird als „fatty streaks“ bezeichnet, die auch makroskopisch als gelbe Flecken sichtbar sind. Die aufgenommenen Lipoproteine aktivieren die Schaumzellen, sodass in der Folge immer mehr Entzündungszellen in die atherosklerotische Läsion einwandern und den entzündlichen Prozess aufrechterhalten (Ross, 1999). Die Entzündungszellen sowie die Zellen der Gefäßwand sezernieren weiterhin Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen in die Intima fördern (Libby et al., 2002). Das von den Muskelzellen dort vermehrt synthetisierte kollagene Bindegewebe und die voranschreitende Akkumulation von Lipiden mündet in der Entstehung eines Atheroms. Dieses ist von einer fibrösen Kappe aus Kollagen und glatten Muskelzellen zum Gefäßlumen hin bedeckt (Weber und Noels, 2011; Zaman et al., 2000). Im Plaqueinneren bildet sich ein nekrotischer Kern, der das Resultat von Apoptose, Nekrose, Lipidakkumulation und einer gesteigerten proteolytischen Aktivität ist. Die Gefäßwand selbst wird durch den Umbau zunehmend dicker. Im Verlauf führt der Kreislauf aus der Ansammlung von Entzündungszellen, der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen sowie der Bildung fibrösen Gewebes zu einer zunehmenden Vergrößerung der Läsion. Eine Lumeneinengung und ein veränderter Blutfluss sind die Folge (Ross, 1999). Behindert ein stenosierender, atherosklerotischer Plaque den Blutfluss in den Herzkranzgefäßen, kann dies zu einem Missverhältnis

zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Herzmuskel führen. Klinisch zeigt sich die Diskrepanz vor allem unter körperlicher Belastung in Form des Angina pectoris-Anfalles mit retrosternalen und gegebenenfalls ausstrahlenden Schmerzen (Montalescot et al., 2013).

Die weitere Entwicklung des Plaques wird von seiner fortschreitenden Instabilität bestimmt. Das kollagene Bindegewebe, das zur Stabilität des Plaques und seiner fibrösen Kappe beiträgt, wird durch die proteolytischen Enzyme der aktivierten Makrophagen zunehmend abgebaut, sodass die Gefahr einer Ruptur steigt (Libby et al., 2002). Kommt es zur Erosion oder Ruptur eines Plaques, triggert dies die Bildung eines plättchenreichen Thrombus, der die Arterie teilweise oder komplett verschließen kann. Klinisch äußert sich der akute Verschluss eines Herzkranzgefäßes und der damit einhergehende akute Myokardinfarkt in Form von massiven Brustschmerzen, gegebenenfalls mit Ausstrahlung in die Arme oder den Kiefer (Chapman, 2007).

Der akute Myokardinfarkt stellt eine mögliche klinische Manifestation der koronaren Herzkrankheit dar. Grundsätzlich ist bei der koronaren Herzkrankheit zwischen der chronischen koronaren Herzkrankheit und den akuten Ereignissen zu unterscheiden. Die chronische koronare Herzkrankheit kann sich als stabile Angina pectoris, stille Ischämie oder Herzinsuffizienz manifestieren. Zu den akuten Ereignissen werden die instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod gezählt (Hamm et al., 2011).

### 1.1.3 Die chronische koronare Herzkrankheit

Eine typische klinische Manifestation der koronaren Herzkrankheit ist die belastungsabhängige, stabile Angina pectoris. Die stabile Angina pectoris ist definiert als ein durch körperliche oder psychische Belastung reproduzierbarer, retrosternaler Thoraxschmerz von kurzer Dauer, der in Ruhe oder nach Gabe von Nitroglycerin nachlässt. Belastungsdyspnoe kann ebenfalls ein Hinweis für das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit sein, aber auch gänzlich asymptomatische Verläufe sind möglich (Montalescot et al., 2013).

## Diagnostik und Therapie

Zur Diagnosestellung der stabilen Angina pectoris werden bei typischer Anamnese und Symptomatik nach aktueller Leitlinie zunächst verschiedene nicht-invasive Verfahren genutzt, um den Verdacht auf eine stenosierende koronare Herzkrankheit zu erhärten. Dazu gehören unter anderem funktionelle Verfahren, wie die Belastungsergometrie, die Stress-Echokardiographie oder Myokardszintigraphie, die eine kardiale Belastung erzeugen sowie morphologische Verfahren, wie die kardiale Computertomographie. Bei Patienten, bei denen therapeutische Konsequenzen im Sinne einer revascularisierungsbedürftigen Stenose zu erwarten sind, erfolgt eine invasive Koronarangiographie. Darunter fallen zum einen diejenigen Patienten mit starken Symptomen, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine stenosierende koronare Herzkrankheit vorliegt (Vortestwahrscheinlichkeit >85 %). Zum anderen diejenigen, bei denen sich pathologische Befunde in der nicht-invasiven Diagnostik zeigen und trotz konservativem Therapieversuch eine Persistenz der Symptomatik bestehen bleibt. Während der Koronarangiographie kann eine intervenierungsbedürftige Stenose therapeutisch durch perkutane transluminale koronare Angioplastie und Stentimplantation behandelt werden oder es wird die Indikation für eine Bypass-Operation gestellt (Montalescot et al., 2013).

Ziel der Diagnostik und frühzeitigen Therapie der chronischen koronaren Herzkrankheit ist, eine Abnahme der Symptome zu erzielen, die Prognose der Patienten zu verbessern und das Auftreten schwerer Komplikationen, wie den Myokardinfarkt, den plötzlichen Herztod oder die Herzinsuffizienz zu verhindern (Montalescot et al., 2013).

2015 wurden in Deutschland schätzungsweise 900.000 Herzkatheteruntersuchungen durchgeführt, in denen jedoch nur in 40 % der Fälle eine perkutane Katheterintervention erfolgte (Fleck und Hamm, 2016). Die Sterblichkeit im Krankenhaus bei einer isolierten Koronarangiographie lag bei 1,41 %, die Häufigkeit schwerer klinischer Ereignisse betrug 1,59 %. Zu den intraprozeduralen Komplikationen zählen unter anderem der akute koronare Verschluss, die transitorische ischämische Attacke, Schlaganfall oder Tod (Fleck und Hamm, 2016). In Hinblick auf die Zukunft wäre eine zahlenmäßige Reduktion der invasiven Diagnostik zugunsten nicht-invasiver diagnostischer Methoden wünschenswert, die jedoch eine gleichbleibende diagnostische Sicherheit gewährleisten müssten (Albus et al., 2017). Um die Anzahl unnötiger Untersuchungen zu verringern,

wäre ein Biomarker hilfreich, der das Vorhandensein signifikanter Koronarstenosen anzeigen könnte, ohne dass eine mit Risiken behaftete Herzkatheteruntersuchung erfolgen müsste.

## 1.2 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, aus etwa 22 Nukleotiden bestehende, nicht kodierende Ribonukleinsäuren (RNA), die posttranskriptional die mRNA Stabilität und Translation beeinflussen und damit eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen spielen (Kloosterman und Plasterk, 2006; Mitchell et al., 2008).

Die erste miRNA, lin-4, wurde 1993 in der Wurmspezies *Caenorhabditis elegans* von Lee et al. (1993) entdeckt. 2001 zeigten Lagos-Quintana et al. (2001), dass miRNAs auch in Wirbeltieren vorkommen, sodass seit ihrer Entdeckung inzwischen beinahe 1000 verschiedene humane miRNAs identifiziert werden konnten (Devaux et al., 2012).

MiRNAs machen laut Studien 1-5 % des menschlichen Genoms aus (Macfarlane und Murphy, 2010). Die genetische Information der einzelnen miRNAs ist sowohl in Introns von kodierenden und nicht kodierenden Genen als auch in Exons eingebaut. Nach der Transkription durchläuft die Vorläufer pri-miRNA verschiedene Reifungsprozesse, an denen die beiden RNase Endonukleasen III Dicer und Drosha beteiligt sind. Die reife, aus circa 22 Nukleotiden bestehende miRNA wird in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut, der die miRNA zur Ziel-mRNA führt. Die in Teilen komplementäre Bindung an die Ziel-mRNA hemmt entweder die Translation oder führt zur Zersetzung der Ziel-mRNA, was letztendlich in einer verminderten Proteinproduktion resultiert (Urbich et al., 2008). Jede miRNA kann hunderte Ziel-mRNA Moleküle mit oft verwandten Funktionen regulieren und dadurch komplexe biologische Prozesse steuern (Small und Olson, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass mindestens 30 % aller proteinkodierender Gene durch miRNAs reguliert werden (Macfarlane und Murphy, 2010).

MiRNAs spielen eine Rolle für viele biologische Prozesse, wie Krebserkrankungen, Zellmetabolismus oder Stammzellregulation sowie für die Immunfunktion. Inzwischen haben sich miRNAs ebenfalls als wichtige Regulatoren verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, auch in Bezug auf kardiovaskuläre Gesundheit und

Krankheit, herausgestellt (Devaux et al., 2012; Fichtlscherer et al., 2011). Erste Hinweise, dass miRNAs eine entscheidende Rolle im kardiovaskulären System spielen, ergaben sich durch die Entdeckung, dass der Verlust des miRNA verarbeitenden Enzyms Dicer zu Defekten in der Angiogenese, Gefäßanordnung und Herzentwicklung führte (Fichtlscherer et al., 2010; van Rooij und Olson, 2007). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass miRNA-145, miRNA-126 und miRNA-155 an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind und auch der Fettstoffwechsel und der Blutzuckerhaushalt scheinen einer Regulation durch miRNAs zu unterliegen (Weber, 2013).

MiRNAs werden gewebs- und zellspezifisch exprimiert. So wird zum Beispiel miRNA-208a ausschließlich in Herzmuskelzellen exprimiert. MiRNA-1, miRNA-133a/b und miRNA-499 sind muskuläre miRNAs, die nicht exklusiv in Herzmuskelzellen, sondern auch in Skelettmuskelzellen gebildet werden (Fichtlscherer et al., 2011). MiRNA-126, miRNA-130a, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-21, miRNAs der let-7 Familie und die miRNAs, die zum 17~92 Cluster gehören (miRNA-17, miRNA-20a, miRNA-92-a), werden in der Gefäßwand, insbesondere in den Endothelzellen exprimiert (Fichtlscherer et al., 2010; Urbich et al., 2008).

Studien haben gezeigt, dass miRNAs nicht nur in den Zellen wirken, sondern auch von Zellen freigesetzt und exportiert werden können (Mitchell et al., 2008). Zirkulierende miRNAs können im Blut innerhalb extrazellulärer Vesikel, wie Exosomen, Mikrovesikeln oder apoptotischen Zellabschnürungen, oder an Proteinen gebunden transportiert werden (Jansen et al., 2014). Die miRNAs liegen im Serum oder Plasma in einer bemerkenswert stabilen Form vor, die wiederholtem Einfrieren und Auftauen sowie dem Abbau durch zirkulierende Ribonukleasen standhält (Fichtlscherer et al., 2010). Die in Mikrovesikeln verpackten miRNAs scheinen dabei einen Mechanismus der interzellulären Kommunikation und Signaltransduktion darzustellen (Jansen et al., 2014). Einige Studien lassen vermuten, dass die miRNAs zu Empfängerzellen geleitet werden und dort die Genexpression beeinflussen (Zhou et al., 2013).

Nimmt man an, dass die Anzahl der zirkulierenden miRNAs sich abhängig von dem Vorliegen einer Krankheit und deren Ausmaß ändert, könnten sich miRNAs als wertvolle Biomarker zur Diagnostik und Monitoring von kardiovaskulären Krankheiten und anderen Erkrankungen herausstellen (Hayes et al., 2014; Gupta et al., 2010). In Bezug auf Krebserkrankungen wurden miRNAs bereits als sensitive und informative Biomarker

für die Diagnostik verschiedener Krebsdiagnosen eingebracht (Ai et al., 2010). Fichtlscherer et al. (2010) konnten zeigen, dass die koronare Herzkrankheit zu veränderten zirkulierenden vaskulären und myokardialen miRNA-Expressionsmustern führt. Bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit war zum Beispiel die Anzahl der zirkulierenden vaskulären und vor allem endothelialen miRNAs, wie miRNA-126, miRNA-17 und miRNA-92, im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant vermindert. MiRNAs, die im Herzmuskel exprimiert werden, wie miRNA-133 und miRNA-208a, waren hingegen erhöht. Veränderungen in einem miRNA-Panel, das miRNA-132, miRNA-150 und miRNA-186 enthielt, erleichterten unlängst die Diagnose einer instabilen Angina pectoris (Zeller et al., 2014). Verschiedene Studien konnten des Weiteren zeigen, dass bei einem akuten Myokardinfarkt vor allem miRNAs myokardialen Ursprungs freigesetzt werden, darunter miRNA-1, miRNA-208a/b, miRNA-133 und miRNA-499 (Ai et al., 2010; Corsten et al., 2010; Liebetrau et al., 2013; Li et al., 2012; Fichtlscherer et al., 2011).

### 1.2.1 MiRNA-Kinetik bei koronarer Ischämie

Vorübergehende koronare Ischämie beeinträchtigt lokal und systemisch die Funktion des Gefäßendothels sowie die myokardiale Perfusion. Ob sich jedoch die Plasmaspiegel zirkulierender miRNAs vaskulären oder myokardialen Ursprungs als Reaktion auf vorübergehende koronare Ischämie verändern, ist unklar. Da miRNAs vor allem als Antwort auf kardiale Ischämie freigesetzt werden, untersuchten wir die Kinetik zirkulierender miRNAs als Reaktion auf kardialen Stress, ausgelöst durch eine Dobutamin-Stressechokardiographie Untersuchung. Mit Hilfe der Studie wollten wir herausfinden, ob es möglich ist, anhand des miRNA-Expressionsmusters zwischen Patienten mit und ohne signifikanter koronarer Stenose unterscheiden zu können.

Um diese Fragestellung zu beantworten, entschieden wir uns in unserer Studie für die Untersuchung der Kinetik von folgenden miRNAs, die in der Literatur in Zusammenhang mit Koronarischämie beschrieben waren:

**miRNA-21:** MiRNA-21 ist eine stark exprimierte miRNA im kardiovaskulären System. Sie wird insbesondere von glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen und kardialen Fibroblasten gebildet. Vorherige Studien konnten zeigen, dass sich die

Expression in Herzgewebe und Gefäßen bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz, ischämischer Herzkrankheit oder proliferativer vaskulärer Krankheit, verändert (Cheng und Zhang, 2010).

miRNA-26a: Die miRNA-26 Familie scheint eine zentrale Rolle für kardiovaskuläre Erkrankungen zu spielen, indem sie kritische Signalwege und Zielstrukturen, die relevant für Endothelzellwachstum, Angiogenese und die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt sind, kontrolliert. Weitere Studien, die die Rolle von miRNA-26a in glatten Gefäßmuskelzellen, kardialen Fibroblasten und Herzmuskelzellen untersuchten, legen nahe, dass miRNA-26a eine Reihe von kardiovaskulären Reparaturmechanismen beeinflusst (Icli et al., 2014).

miRNA-27a: MiRNA-27a ist Mitglied des 23-27-24 Clusters und wird stark in Endothelzellen exprimiert (Urbich et al., 2012). In vivo und in vitro durchgeführte Studien deuten an, dass miRNA-27a als diagnostischer und prognostischer Marker für Atherosklerose dienen könnte. MiRNA-27a scheint unter anderem eine wichtige Rolle in Bezug auf Angiogenese, Lipidmetabolismus und oxidativen Stress zu spielen (Chen et al., 2012).

miRNA-92a: MiRNA-92a ist Teil des miRNA-17-92 Clusters und wird stark in Endothelzellen in Abhängigkeit von der Scherspannung exprimiert (Feinberg und Moore, 2016). Geringe Scherspannung und der Kontakt mit oxidierten low-density Lipoproteinen induzieren dabei eine gesteigerte Expression, was zur Endothelaktivierung und Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen führt (Loyer et al., 2014). Nach Ischämie hemmt die Überexpression von miRNA-92a das Endothelzellwachstum und die Gefäßneubildung, indem sie auf Endothel schützende Gene, wie Integrin  $\alpha 5$ , Sirt-q und die gefäßprotektiven Transkriptionsfaktoren Krüppel-like factor 2 und 4, abzielt (Daniel et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von miRNA-92a zu einer gesteigerten Neovaskularisation und funktionellen Erholung nach Ischämie führt sowie die Endothelneubildung fördert (Doebele et al., 2010; Daniel et al., 2014).

miRNA-126-3p: MiRNA-126 wird verstärkt in Endothelzellen exprimiert und ist essentiell für die Angiogenese (Fichtlscherer et al., 2010). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die endotheliale Expression von miRNA-126 bei Patienten mit stabiler koronarer

Herzkrankheit, symptomatischer stabiler Angina pectoris oder akutem Herzinfarkt fehlreguliert ist (Schulte et al., 2015). So weisen Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Patienten verminderte Werte für zirkulierende miRNA-126 auf (Fichtlscherer et al., 2010; Zampetaki et al., 2010). Mehrere Studien belegen, dass miRNA-126 von aktivierten oder apoptotischen Endothelzellen in Mikropartikeln oder apoptotischen Körpern verpackt und freigesetzt wird (Jansen et al., 2013; Zerneck et al., 2009; Jansen et al., 2017a). Die endotheliale Freisetzung von miRNA-126 ist dabei abhängig von den bestehenden hämodynamischen Kräften und ist erhöht, wenn geringer Scherstress vorherrscht (Zhou et al., 2013). Die freigesetzte miRNA-126 übt eine gefäßschützende Wirkung aus, indem sie in gesunden Endothelzellen die CXCL12 Expression indirekt induziert und somit die Rekrutierung von gefäßwachstumsfördernden Zellen initiiert. Letztendlich reduziert dies die Atherogenese (Wei et al., 2013).

miRNA-133a: MiRNA-133a wird in Herzmuskelzellen exprimiert und ist an der Kontrolle des Muskelwachstums, der kardialen Entwicklung und Hypertrophie beteiligt (Fichtlscherer et al., 2010). Bei kardialen Schaden, wie er zum Beispiel nach einem Herzinfarkt auftritt, wird miRNA-133a aus den Kardiomyozyten in verstärktem Ausmaß freigesetzt. MiRNA-133a wird jedoch nicht ausschließlich von Herzmuskelzellen, sondern auch von Skelettmuskelzellen exprimiert, sodass Erkrankungen und Verletzungen der Skelettmuskulatur ebenfalls zu erhöhten miRNA-133a Spiegeln führen können (Fichtlscherer et al., 2011).

miRNA-199a-5p: Laut vorangegangenen Studien scheint miRNA-199a eine kardioprotektive Funktion einzunehmen. So reduzierte die durch miRNA-199a vermittelte Stabilisation von p53 in Mäusen die Apoptoserate von Herzmuskelzellen. Ebenso stimulierte die Behandlung von Mäusen mit exogener miRNA-199a nach einem Herzinfarkt die kardiale Regeneration, sodass eine fast vollständige Erholung der kardialen Funktionsparameter erreicht werden konnte (Rane et al., 2009; Eulalio et al., 2012). In Endothelzellen wiederum fördert miRNA-199a die Proliferation, Gefäßbildung und das Zellüberleben (Zhang et al., 2013; Shatseva et al., 2011). Jansen et al. (2014) postulierten in einer Studie, dass die vermehrte Expression von miRNA-199a in



zirkulierenden Mikrovesikeln bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert ist.

miRNA-222: MiRNA-222 wird von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in der Gefäßwand exprimiert und scheint bei Patienten mit atherosklerotischen Gefäßerkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, im Blut vermindert vorzuliegen (Liu et al., 2009; Jansen et al., 2015; Li et al., 2011). In den Endothelzellen scheint miRNA-222 antiinflammatorisch zu wirken. So reduziert sie über die Hemmung der Zelladhäsionsmolekül-ICAM-1-Expression möglicherweise Gefäßentzündung und Atheroskleroseentstehung (Jansen et al 2015). In den glatten Gefäßmuskelzellen scheint miRNA-222 wiederum die Proliferation zu fördern und Einfluss auf die Bildung einer Neointima zu nehmen (Liu et al., 2009).

miRNA-223: MiRNA-223 scheint vor allem in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks und den davon abstammenden Blutzellen, vornehmlich in Leukozyten und Thrombozyten, exprimiert zu werden (Shan et al., 2015). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass miRNA-223 an der Regulation mehrerer inflammatorischer Gene und der Cholesterolemie beteiligt ist und somit eine Rolle bei der endovaskulären Entzündung einnimmt. Dabei scheint miRNA-223 gemeinsam mit dem high-density Lipoprotein (HDL) antiinflammatorische Effekte zu vermitteln. MiRNA-223 wurde als Biomarker für die Diagnose der koronaren Herzkrankheit beschrieben und auch bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden erhöhte Serumwerte für miRNA-223 festgestellt (Schulte et al., 2015). Schulte et al. (2015) konnten weiterhin zeigen, dass miRNA-223 einen prognostischen Marker für kardiovaskulären Tod bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit darstellt.

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob zirkulierende miRNAs unterschiedlich reguliert werden bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, in Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer signifikanten koronararteriellen Stenose. Da miRNAs vor allem als Antwort auf kardiale Ischämie freigesetzt werden, untersuchten wir die Kinetik zirkulierender miRNAs als Reaktion auf kardialen Stress, ausgelöst durch eine

Dobutamin-Stressechokardiographie. Am Folgetag der echokardiographischen Untersuchung erfolgte eine Koronarangiographie, um das Vorliegen einer signifikanten (>80 %) Koronarstenose zu untersuchen. Anhand dessen sollte untersucht werden, ob es möglich ist, mithilfe des miRNA-Expressionsmusters sowie der Plasma-miRNA-Kinetik zwischen Patienten mit oder ohne signifikanter koronarer Stenose zu unterscheiden. Für die Zukunft könnten sich damit neue Möglichkeiten in der Diagnostik der stenosierenden koronaren Herzkrankheit bieten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

##### RNA Isolation:

- Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Nano Drop 2000c Spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

##### Real-Time PCR:

- 7500 Fast Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Mastercycler® und Mastercycler® pro, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

##### Schüttel- und Mischgeräte:

- Velp Scientifica 2x<sup>3</sup>, VELP Scientifica Srl, Usmate, Italien
- Lab dancer, Ika®, Staufen, Deutschland

##### Zentrifugen:

- Zentrifuge 5430R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Laborfuge 400R und Biofuge fresco, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

#### 2.1.2 Allgemeines

- PCR 96-Well TW-MT-Platten, farblos, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
- MicroAmp® Optical Adhesive Film, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Pipetten, Eppendorf Reserach® und Eppendorf Research® Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen, verschiedene Größen, nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
- Safe-Lock Tubes, verschiedene Größen, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Microtubes 0,6 ml, klar, Axygen inc, Union City, USA
- PCR Soft Tubes 0,2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.3 Reagenzien

- 2-Propanol Rotipuran®, Carl Roth GmbH u. Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
- Chloroform, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
- Ethanol, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Caenorhabditis elegans microRNA-39 (cel-miR-39,5 nmol/L, Qiagen)
- Trizol LS Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- UltraPure™ DNase/RNase-free distilled Water, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 2.1.4 Kits und Mastermix

- TaqMan® Micro RNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- TaqMan® Universal Mastermix II, no UNG, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 2.1.5 Real-Time PCR Primer

- TaqMan® Micro RNA Assays Nummer 4440888, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA :
  - Assay Name: hsa-miR-21, Assay ID: 000397
  - Assay Name: hsa-miR-26a, Assay ID: 000405
  - Assay Name: hsa-miR-27a, Assay ID: 000408
  - Assay Name: hsa-miR-39, Assay ID: 000200
  - Assay Name: hsa-miR-92a, Assay ID: 000431
  - Assay Name: hsa-miR-126-3p, Assay ID: 002228
  - Assay Name: hsa-miR-133a, Assay ID: 002246
  - Assay Name: hsa-miR-199-5p, Assay ID: 000498
  - Assay Name: hsa-miR-222, Assay ID: 002276
  - Assay Name: hsa-miR-223, Assay ID: 002295

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patientenkollektiv und Rekrutierung

Alle Untersuchungen wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. Von jedem Probanden lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Studie wurde im Deutschen Register Klinischer Studien in Freiburg (DRKS-ID:DRKS00000737) registriert und von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (No.169/10).

Zwischen März 2011 und März 2012 wurden 105 Patienten mit bekannter stabiler koronarer Herzkrankheit hinsichtlich eines Einschlusses in die Studie überprüft. Bei allen Patienten war aufgrund der typischen Symptomatik bereits die Indikation für eine Koronarangiographie gestellt worden. Sechs Patienten wurden aus der Studie ausgeschlossen, da klinisch und laborchemisch ein akuter oder subakuter Myokardinfarkt vorlag. Weitere 14 Patienten mit entweder malignen und entzündlichen Erkrankungen oder schwerer Leber- oder Niereninsuffizienz konnten ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen werden. Fünf Patienten lehnten die Teilnahme an der Studie ab, sodass schließlich 80 Patienten nach Unterzeichnen einer Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen werden konnten.

### 2.2.2 Dobutamin-Stressechokardiographie Protokoll

Am Tag vor der geplanten Koronarangiographie erhielten alle Studienteilnehmer eine Dobutamin-Stressechokardiographie. Vor der Stressechokardiographie wurden die teilnehmenden Patienten gebeten, diejenigen Medikamente, die den Effekt von Dobutamin antagonisieren könnten, beispielsweise Betablocker, nicht einzunehmen. Zu Beginn der Untersuchung wurden zunächst 5 µg Dobutamin/Kg/min als Infusionslösung verabreicht. Alle drei Minuten wurde die Dosierung um 10 µg Dobutamin/kg/min erhöht bis auf ein Maximum von 40 µg/Kg/min und bis 85 % der altersentsprechenden maximalen Herzfrequenz erreicht wurden (Sicari et al., 2008). Sofern die maximale Herzfrequenz nicht erreicht werden konnte, wurde diesen Patienten, nach Ausschluss von Kontraindikationen, 1 mg Atropin verabreicht. Die Stressechokardiographie wurde vorzeitig beendet, wenn die untersuchten Patienten eine signifikante Ischämie oder

Arrhythmie entwickelten. Falls notwendig wurden zur klinischen Stabilisierung Betablocker verabreicht.

Alle Stressechokardiographien wurden unter Verwendung des Phillips iE33 Systems mit einem X5-1 Schallkopf (Philips Medical System, Niederlande) ausgeführt. Das Herz wurde in der parasternalen langen und kurzen Achse, in der apikalen langen Achse und im apikalen Vier- und Zwei-Kammerblick echokardiographiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte zu vier Untersuchungszeitpunkten: in Ruhe, nach jeder Dobutamin-Infusionssteigerung, am Stresshöhepunkt und nach Beendigung des auslösenden Stresses. Bei Vorliegen einer deutlichen oder fraglichen Dyssynergie wurde eine komplette echokardiographische Untersuchung vollzogen und aufgenommen, um das Auftreten und das Ausmaß einer myokardialen Ischämie bestmöglich zu dokumentieren. Die Analyse und Bewertung der echokardiographischen Aufnahmen erfolgte unter Verwendung des 17-Segment-Modells des linken Ventrikels und mit Hilfe einer viergradigen Skala zur Bewertung der regionalen Wandbewegungsstörungen (1=normal, 2=hypokinetisch, 3=akinetisch, 4=dyskinetisch).

### 2.2.3 Koronarangiographie

Eine quantitative Koronarangiographie wurde bei allen Patienten entsprechend der Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC) durchgeführt (Montalescot et al., 2013). Eine signifikante Stenose lag per Definition vor, wenn der Durchmesser einer der großen epikardialen Koronargefäße mit einem Durchmesser von  $\geq 2,5$  mm um  $\geq 80$  % eingengt war. Als nicht signifikante Stenose wurde eine Einengung von  $< 50$  % des Durchmessers definiert. Im Falle einer Stenose, die einer Revaskularisation bedurfte, wurde dem durchführenden Arzt, der im Unklaren über die Biomarker Ergebnisse war, die Entscheidung über die anschließende geeignete interventionelle Vorgehensweise überlassen. Dabei wurden die ESC Richtlinien für myokardiale Revaskularisation befolgt (Windecker et al., 2014).

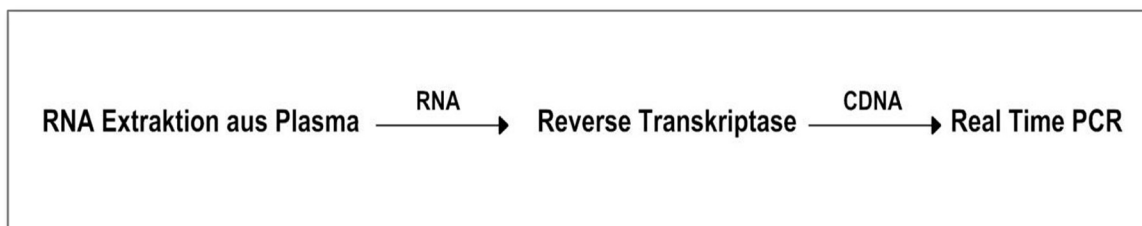
### 2.2.4 Probengewinnung

Insgesamt wurde den Patienten vier Mal Blut für die miRNA-Bestimmung abgenommen: vor der Dobutamin-Stressechokardiographie, direkt im Anschluss an die Untersuchung sowie jeweils vier und 24 Stunden danach. Dafür wurde den Patienten venöses Blut

unter sterilen Bedingungen aus der Vena mediana cubiti entnommen und dieses mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gepuffert. Zusätzlich wurden Blutproben für Routine-Analysen abgenommen. Die Blutproben wurden mit 1500 g über 15 Minuten und anschließend noch einmal mit 13000 g über 2 Minuten zentrifugiert, um plättchenarmes Plasma zu generieren. Danach wurden die Blutproben in RNase/DNase freie Tubes gefüllt, die bis zur miRNA-Messung im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert wurden.

### 2.2.5 MiRNA-Quantifizierung im Plasma

Um den miRNA-Gehalt einer Blutprobe bestimmen zu können, muss zunächst die gesamte RNA aus dem Plasma isoliert werden. Im zweiten Schritt werden aus der isolierten RNA die zu untersuchenden miRNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben, um im darauffolgenden Schritt mittels Real-Time PCR amplifiziert und quantifiziert werden zu können.



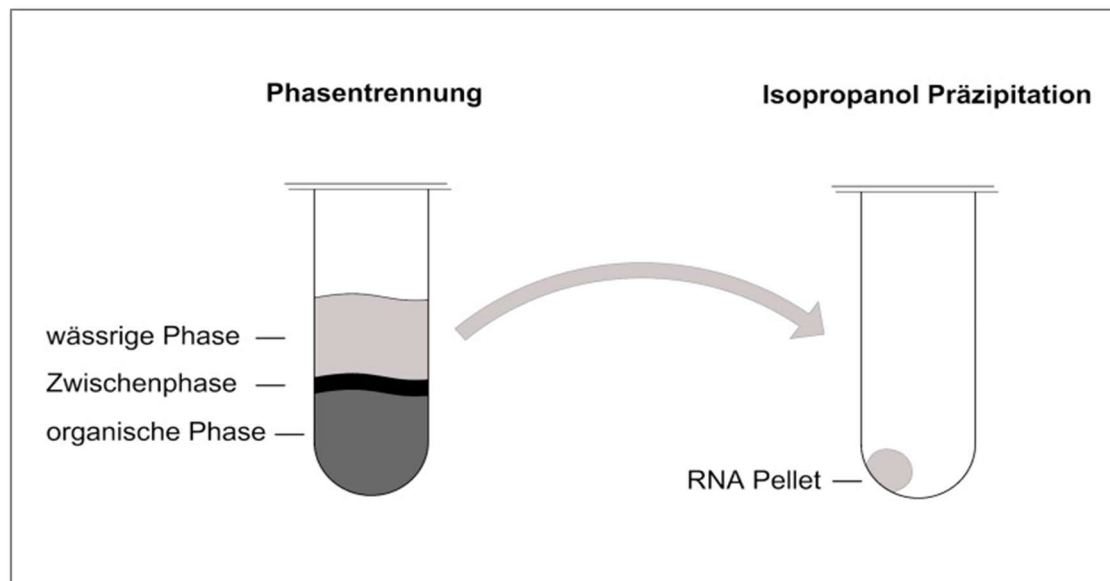
**Abb. 1:** Schematischer Ablauf der miRNA-Quantifizierung. Nach der Extraktion aus dem Plasma wird die gewonnene RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird dann für den Reaktionsablauf der Real-Time PCR verwendet.

### RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte auf Grundlage des TRIzol basierten miRNA-Isolationsprotokolls. Synthetische *Caenorhabditis elegans* miRNA-39 (cel-miR-39, 5 nmol/L, Qiagen), die keine homologen Sequenzen zur menschlichen miRNA aufweist, wurde als Referenz-miRNA-Inhalt hinzugegeben, um Unterschiede in der RNA-Isolation auszugleichen (Devaux et al., 2012; Fichtlscherer et al., 2010).

Die TRIzol basierte RNA-Isolation beruht auf der Single-Step-Methode nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass RNA

und DNA nach der Extraktion, unter Verwendung einer sauren Lösung, voneinander getrennt werden. Nach der Zentrifugation verbleibt die RNA unter sauren Bedingungen in der oberen wässrigen Phase, während der überwiegende Anteil der DNA und Proteine entweder in der Zwischenphase oder der unteren organischen Phase verbleibt. Die vollständige RNA wird dann durch Zugabe von Isopropanol durch Präzipitation gewonnen (Chomczynski und Sacchi, 2006).



**Abb. 2:** RNA-Isolation. Durch Verwendung einer sauren Lösung werden RNA und DNA voneinander getrennt. Nach der Zentrifugation entstehen drei Phasen: Die wässrige Phase enthält die RNA. DNA und Proteine verbleiben in der Zwischenphase und organischen Phase. Nach Zugabe von Isopropanol zur wässrigen Phase fällt die RNA als Pellet aus.

MiRNA-Isolationsprotokoll:

1. Die eingefrorene Probe EDTA Plasma auf Eis auftauen.
2. 250 µl aufgetautes Plasma in ein 1,5 ml großes Tube überführen.
3. 750 µl TRIzol® LS dazu geben, die Probe durch Vortexen homogenisieren.
4. 5 µl 1 µM sny-cel-miR-39 (Caenorhabditis elegans miR-39) dazugeben, vortexen.
5. Die Probe bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubieren.
6. 150 µl Chloroform hinzufügen, alles gut vortexen.
7. Die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.



8. Die Probe 15 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugieren, sodass sich die Probe in drei Phasen aufteilt: eine untere rote Phase, eine Zwischenphase und eine obere farblose, wässrige Phase.
9. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, mit der Pipette abnehmen und in ein neues Tube überführen.
10. Für die Ausfällung der RNA 500 µl 100 %-iges Isopropanol zu der wässrigen Phase dazugeben und das Tube danach invertieren.
11. Die Probe bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubieren.
12. Die Probe für 15 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugieren. Die vollständige RNA präzipitiert als weißes gelartiges Pellet auf den Boden des Tubes.
13. Den flüssigen Überstand mit der Pipette verwerfen.
14. Das isolierte Pellet mit 1 ml 75 %-igem Ethanol zum Waschen resuspendieren.
15. Die Probe für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren.
16. Den kompletten wässrigen Überstand mit der Pipette abnehmen, sodass nur noch das Pellet im Tube verbleibt.
17. Das isolierte Pellet unter dem Abzug trocknen.
18. Das Pellet mit 30 µl destilliertem Wasser im Thermomixer bei 56 °C für 10 Minuten resuspendieren.

Nach der RNA-Isolation wurde der totale RNA-Gehalt der Proben mittels Nanodrop Spectrophotometer ermittelt.

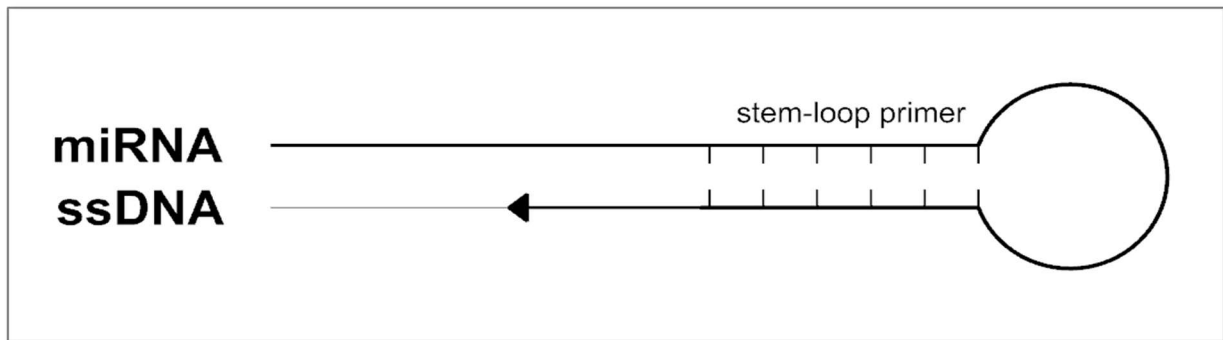
#### Quantifizierung der miRNAs durch Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) dient dem empfindlichen und spezifischen Erkennen und Quantifizieren von Nukleinsäurezielen. Sie basiert auf der Methode der Polymerasekettenreaktion, die es ermöglicht, durch den Einsatz von DNA-Polymerasen und kurzen, sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern, ausgewählte DNA-Abschnitte in großen Mengen zu vervielfältigen. Die Polymerasekettenreaktion beinhaltet circa 40 Zyklen, in denen jeweils dieselben Phasen durchlaufen werden. In der Denaturierungsphase wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) auf 95 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Danach wird die Reaktion auf 60 °C abgekühlt, damit die Oligonukleotid-Primer an die nun vorliegenden Einzelstränge binden können (Hybridisierung). In der Verlängerungsphase binden die DNA-Polymerasen an die

Primer und erstellen unter Zugabe von Nukleotiden einen komplementären, neuen DNA-Strang. Der entstandene Doppelstrang muss für den nächsten Zyklus wieder durch Erhitzen getrennt werden.

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es, DNA in hohem Maße zu vervielfältigen. Es ist jedoch nicht möglich, Aussagen über die Menge der DNA vor Beginn der Amplifikation zu machen, da keine Korrelation zwischen Anfangs- und Endmenge besteht. Real-Time PCR löst dieses Problem, indem der Amplifikationsprozess durch Fluoreszenztechnologien sichtbar gemacht wird und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die DNA-Vervielfältigung am effizientesten in der frühen, exponentiellen Phase der Reaktion ist. Die Schnelligkeit, in der das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert (threshold, Ct Wert) erreicht, korreliert mit der Menge der ursprünglichen Zielsequenz vor Beginn der Amplifikation und ermöglicht somit die Quantifizierung. Ein weiterer Vorteil der Real-Time PCR ist, dass auch sehr kleine Mengen spezifischer Nukleinsäuresequenzen detektiert und quantifiziert werden können.

Da die Polymerasekettenreaktion nur DNA vervielfältigen kann, ist es notwendig, dass die zu untersuchende RNA in einer vorherigen Reaktion mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird (Valasek und Repa, 2005). Stem-loop Primer (TaqMan miRNA assays) binden an das 3`Ende der zu transkribierenden miRNA und bilden den Ansatzpunkt der Reversen Transkriptase, die unter Zugabe von Oligonukleotiden einen komplementären DNA-Strang erzeugt. Die verwendeten TaqMan miRNA assays sind spezifisch für reife miRNAs und können zwischen verwandten miRNAs differenzieren, die sich zum Teil nur in einem Nukleotid unterscheiden (Chen et al., 2005). Bei sachgemäßer Durchführung ist die Menge der in der Reaktion hervorgebrachten cDNA proportional zu der jeweiligen RNA-Menge, die als Vorlage diente (Valasek und Repa, 2005).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Reversen Transkriptase. An das Ende der einzelsträngigen miRNA bindet ein Stem-loop Primer, der den Ansatzpunkt der Reversen Transkriptase bildet. Das Enzym erzeugt unter Zugabe von Oligonukleotiden einen komplementären DNA Strang. ssDNA=single-stranded DNA

In der Studie wurden miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-27a, miRNA-92a, miRNA-126-3p, miRNA-133a, miRNA-222, miRNA-223 und miRNA-199-5p im Plasma detektiert. Nach der RNA-Isolation wurden zunächst aus jeder Probe 10 ng RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dabei wurden unter Befolgung des dazugehörigen Herstellerprotokolls die entsprechenden TaqMan miRNA assays und das TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit eingesetzt. Unter Verwendung von sequenzspezifischen TaqMan miRNA assays und einer 7500HT Real-Time PCR Maschine wurden die einzelnen miRNAs amplifiziert und quantifiziert. Jede Probe durchlief in dreifacher Ausführung die Polymerasekettenreaktion. Die bei der Isolation hinzugegebene Cel-miR-39 wurde als endogene Kontrolle genutzt. Ansätze ohne Zugabe von cDNA (NTC, No template control) zeigten, dass die Primer selbst kein Signal erzeugen und dass die verwendeten Reagenzien keine DNA-Kontamination aufweisen. Ein Ct-Wert <40 wurde für alle miRNAs als nicht nachweisbar definiert. Um die jeweilige miRNA-Expression zu quantifizieren, wurde die Delta Ct-Methode verwendet. Die Werte wurden anhand der Werte für cel-miR-39 genormt und werden als  $2^{-\Delta\text{ct}} \log_{10}$  wiedergegeben. Die cel-miR-39 Messungen in den Proben waren gleichbleibend und überschritten nicht 1 Ct-Wert in 99 % der Proben.

### Reaktionsprotokoll Reverse Transkription:

Jeder Reaktionsansatz beinhaltet 7  $\mu\text{l}$  Mastermix, 3  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase Primer und 10 ng Proben RNA.

**Tab. 1:** Mastermix-Ansatz

100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15 $\mu\text{l}$
10 x Reverse Transkriptase Puffer	1,50 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor, 20 U/ $\mu\text{l}$	0,19 $\mu\text{l}$
MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/ $\mu\text{l}$	1,00 $\mu\text{l}$
Nuclease-freies Wasser	4,16 $\mu\text{L}$

**Tab. 2:** Reverse Transkriptase Primer Verdünnungsschema

60 x Reverse Transkriptase Primer	0,25 $\mu\text{l}$
Nuclease-freies Wasser	2,75 $\mu\text{l}$

### Durchführung:

1. 7  $\mu\text{l}$  Mastermix, 3  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase Primer und 5  $\mu\text{l}$  verdünnte RNA in ein Microtube geben.
2. Alles zentrifugieren, sodass sich die Flüssigkeit am Boden befindet.
3. Reverse Transkription im Mastercycler starten.

**Tab. 3:** Mastercycler Programmierung

Schritt	Zeit	Temperatur
1	30 Minuten	16 °C
2	30 Minuten	42 °C
3	5 Minuten	85 °C
4		4 °C

Die in der Reaktion entstandene cDNA kann nun als Matrize für die Amplifikation mittels Real-Time PCR eingesetzt werden.

Reaktionsprotokoll Real-Time PCR:

**Tab. 4:** Reaktionsansatz je Genexpressionsprobe

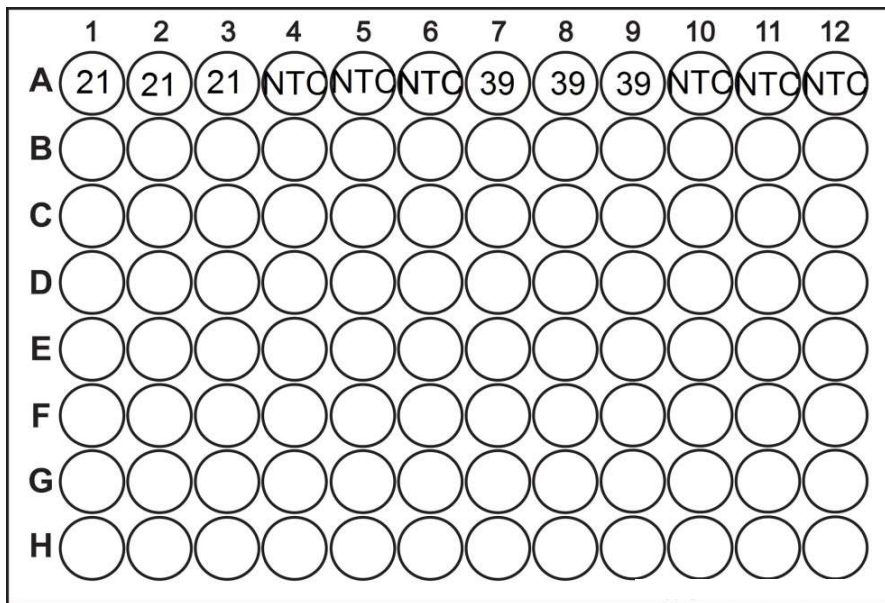
Komponente	Volumen pro Reaktion[ $\mu$ l]	Konzentration
TaqMan® Universal Master Mix II (no UNG)	10	1
TaqMan® Gene Expression Assay	1	1
cDNA Matrize + H <sub>2</sub> O	9	1-100 ng

**Tab. 5:** Reaktionsansatz NTC (No template control)

Komponente	Volumen pro Reaktion[ $\mu$ l]
TaqMan® Universal Master Mix II (no UNG)	10
TaqMan® Gene Expression Assay	1
H <sub>2</sub> O	9

Durchführung:

1. Die entsprechenden Komponenten je Reaktionsansatz in einem Microtube zusammen pipettieren.
2. Den Inhalt des Microtubes kurz vortexen, um die Komponenten zu vermischen.
3. Die Probe kurz zentrifugieren, sodass der Inhalt zu Boden sinkt.
4. 20  $\mu$ l pro Ansatz in die vorgesehene Vertiefung der Reaktionsplatte pipettieren.
5. Die Platte mit einem MicroAmp® Optical Adhesive Film abdecken.
6. Kurze Zentrifugation der Platte, damit der Inhalt in den Vertiefungen zu Boden sinkt und Luftblasen aus der Flüssigkeit entweichen können.
7. Die Reaktionsplatte in das Fast Real-Time PCR System stellen und die Reaktion nach Programmierung der Zeit- und Temperatureinstellung ablaufen lassen.



**Abb. 4:** 96-Well PCR-Reaktionsplatte. Exemplarisch dargestellte Genexpressionsproben für miRNA-21a (21) in dreifacher Ausführung mit miRNA-39 (39) als endogene Kontrollgruppe und No template controls (NTC = Ansätze ohne cDNA-Matrize).

**Tab. 6:** Temperatur- und Zeiteinstellung für den Reaktionsablauf im Fast Real-Time PCR System

	Polymerase Aktivierung (Hold)	PCR (40 Abläufe)	
		Denaturierung	Hybridisierung/ Verlängerung
Temperatur [C°]	95	95	60
Zeit [mm:ss]	10:00	0:15	1:00

### 2.2.6 Statistische Analyse

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich, im Falle der Normalverteilung, um die mittlere Standardabweichung oder bei nicht vorliegender Normalverteilung um den Median und Interquartilsabstand (Interquartilsabstand: Viertelwert 1 - Viertelwert 3). Kontinuierliche Variablen wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests auf die Normalverteilung getestet. Kategoriale Variablen werden als Häufigkeiten und Prozentzahlen angegeben. Für die kontinuierlichen Variablen wurde der Student *t* oder Mann-Whitney *U* Test zum Vergleich zweier Gruppen verwendet. Für den Vergleich von

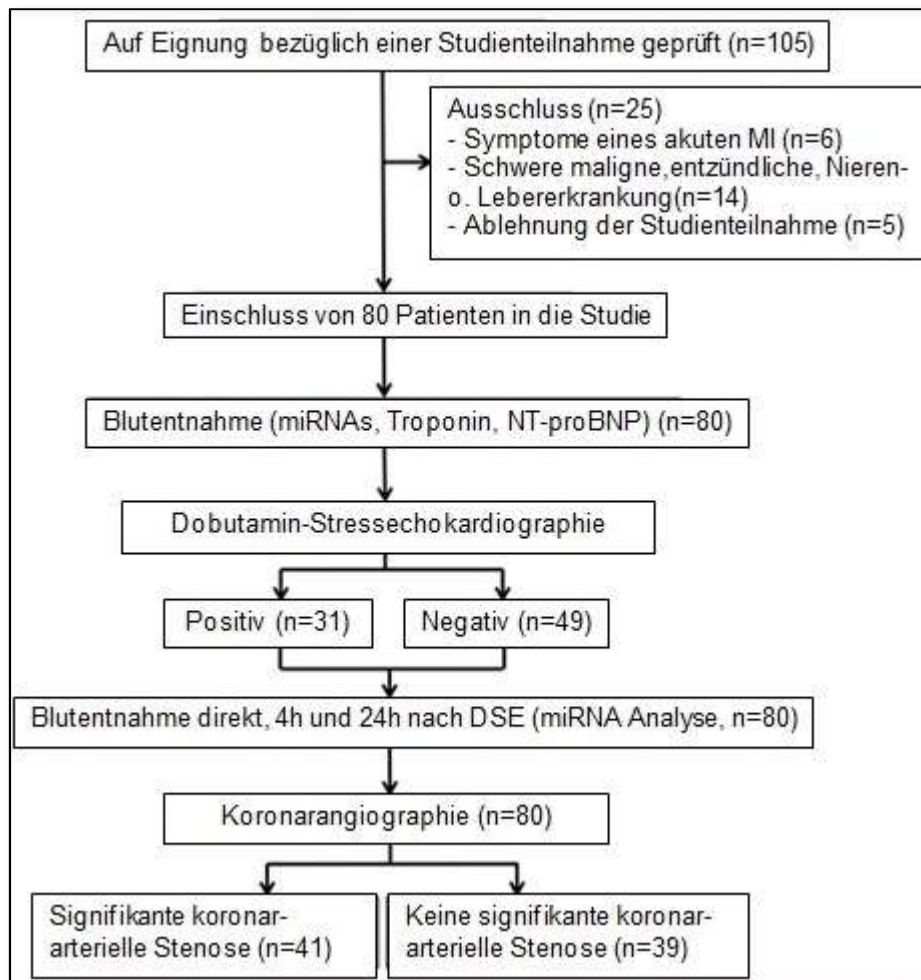
mehr als zwei Gruppen wurde eine univariate ANOVA unter Anwendung der Bonferroni Korrektur berechnet. Alle Tests waren zweiseitig und ein *P* Wert von  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Analyse wurde mit der PASW Statistik Version 22.0.0 64-bit (IBM Corporation) und MedCalc Version 11.1.1.0 (MedCalc Software) sowie GraphPad Prism 5 durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### 3.1 Baseline-Charakteristika

Von den ursprünglich untersuchten 105 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit wurden 80 Patienten in einem Zeitraum von März 2011 bis März 2012 in die Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter betrug  $66,9 \pm 10,9$  Jahre, 71 % der teilnehmenden Patienten waren männlich. Bei allen Patienten wurde einen Tag vor der geplanten koronarangiographischen Untersuchung eine Dobutamin-Stressechokardiographie durchgeführt. In der invasiven quantitativen Koronarangiographie zeigte sich bei 41 der untersuchten Patienten eine signifikante Stenose von  $89,5 \pm 4,3$  % im Durchmesser. Eine signifikante Stenose lag per Definition bei einem Verschluss von  $\geq 80$  % des Durchmessers eines oder mehrerer der großen epikardialen Hauptkoronargefäße mit einem Durchmesser  $\geq 2,5$  mm vor.





**Abb. 5:** Studienaufbau. Entsprechend des Studienprotokolls erhielten alle Patienten eine Dobutamin-Stressechokardiographie Untersuchung (DSE) am Vortag der invasiven Koronarangiographie. Die Blutabnahmen erfolgten vor der Dobutamin-Stressechokardiographie, direkt danach sowie vier und 24 Stunden später. MI: Myokardinfarkt, NT-proBNP: pro-brain natriuretic peptide

Tabelle 7 zeigt die Baseline-Charakteristika der Studienteilnehmer in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten Stenose. Die Patientengruppe, bei der eine signifikante Stenose festgestellt worden war, unterschied sich hinsichtlich der kardiovaskulären Risikofaktoren nicht von der Patientengruppe ohne einer solchen. Auch die Ausgangswerte für miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-27a, miRNA-126-3p, miRNA-133a, miRNA-222, miRNA-223 und miRNA-199a waren in beiden Gruppen vergleichbar. Diejenigen Patienten, bei denen eine signifikante Koronararterienstenose diagnostiziert wurde, wiesen jedoch signifikant höhere Ausgangswerte für die zirkulierende miRNA-92a auf ( $M_{\text{keine Stenose}}=3.81$  vs.  $M_{\text{mit Stenose}}=3.95$ ,  $p=0.03$ ,  $M$ =Mittelwert, Tabelle 1).

**Tab.7:** Baseline-Charakteristika in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten koronarerteriellen Stenose

Charakteristika	Gesamtzahl aller Patienten (n=80)	Keine signifikante Stenose (n=39)	Signifikante Stenose (n=41)	P-Wert
Alter (in Jahren)	66.9 ± 10.9	67.4 ± 10.5	66.4 ± 11.4	0.67
Geschlecht (%)				0.70
weiblich	23 (28.7)	12 (30.8)	11 (26.8)	
männlich	57 (71.3)	27 (69.2)	30 (73.2)	
Kardiovaskuläre Risikofaktoren (%)				
Arterielle Hypertension	80 (100)	39 (100)	41 (100)	k.A.
Hyperlipoproteinämie	66 (82.5)	32 (82.1)	34 (82.9)	0.92
Diabetes mellitus	19 (23.8)	6 (15.4)	13 (31.7)	0.09
Familiäre Belastung	25 (31.3)	14 (35.9)	11 (26.8)	0.38
Rauchen	29 (36.3)	11 (28.2)	18 (43.9)	0.14
Body-Mass-Index (kg/m <sup>2</sup> )	27.6 ± 4.0	27.0 ± 4.2	28.0 ± 3.9	0.41
Laborparameter				
Cholesterin (mg/dL)	180.1 ± 38.9	178.8 ± 42.4	181.2 ± 36.0	0.79
LDL Cholesterin (mg/dL)	101.7 ± 28.1	103.2 ± 30.3	100.2 ± 25.8	0.65
HDL Cholesterin (mg/dL)	49.9 ± 13.3	50.2 ± 15.1	49.6 ± 11.6	0.84
Hämoglobin (g/dL)	14.6 ± 1.5	14.5 ± 1.6	14.7 ± 1.3	0.54
Leukozyten (10 <sup>9</sup> /L)	7.2 ± 1.9	6.9 ± 1.9	7.4 ± 1.9	0.31
Serum-Kreatinin (mg/dL)	1.02 ± 0.31	1.02 ± 0.28	1.04 ± 0.34	0.77
C-reaktives Protein (mg/L)	1.50 (0.78/3.93)	1.55 (0.93/4.48)	1.50 (0.68/3.18)	0.23
Medizinische Vorgeschichte (%)				
früherer Herzinfarkt	28 (35.0)	10 (25.6)	18 (43.9)	0.09

frühere PCI	39 (48.8)	16 (41.0)	23 (56.1)	0.18
frühere Schlaganfälle	2 (2.5)	0 (0)	2 (4.9)	0.16
COPD	7 (8.8)	6 (15.4)	1 (2.4)	0.04
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	10 (12.5)	3 (7.7)	7 (17.1)	0.21
Koronare Herzkrankheit (%)				0.04
1-Gefäßkrankheit	19 (23.8)	14 (35.9)	5 (12.2)	
2-Gefäßkrankheit	21 (26.3)	9 (23.1)	12 (29.3)	
3-Gefäßkrankheit	40 (50.0)	16 (41.0)	24 (58.5)	
DSE Ergebnis (%)				0.001
Positiv	31 (38.8)	8 (20.5)	23 (56.1)	
Negativ	49 (61.2)	31 (79.5)	18 (43.9)	
Linksventrikuläre EF (in %)	57.0 ± 11.8	58.2 ± 10.8	55.9 ± 12.7	0.40
Medikamente bei Aufnahme (%)				
ACE Hemmer o. ARB	66 (82.5)	32 (82.1)	34 (82.9)	0.69
Betablocker	43 (53.8)	18 (46.2)	25 (61.0)	0.18
Statine	45 (56.3)	18 (46.2)	27 (65.9)	0.08
Aspirin	75 (93.8)	36 (92.3)	39 (95.1)	0.60
Zirkulierende miRNAs (log-2dct)				
miRNA-21	4.27±0.33	4.21± 0.18	4.35 ±0.845	0.10
miRNA-26a	4.35±0.22	4.36±0.18	4.34±0.26	0.80
miRNA-27a	4.25±0.24	4.28±0.18	4.23±0.26	0.50
miRNA-92a	3.87±0.03	3.81±0.04	3.95±0.04	0.03
miRNA-126-3p	4.16±0.29	4.21±0.15	4.11±0.37	0.12
miRNA-133a	4.54±0.83	4.54±1.08	4.54±0.31	0.99

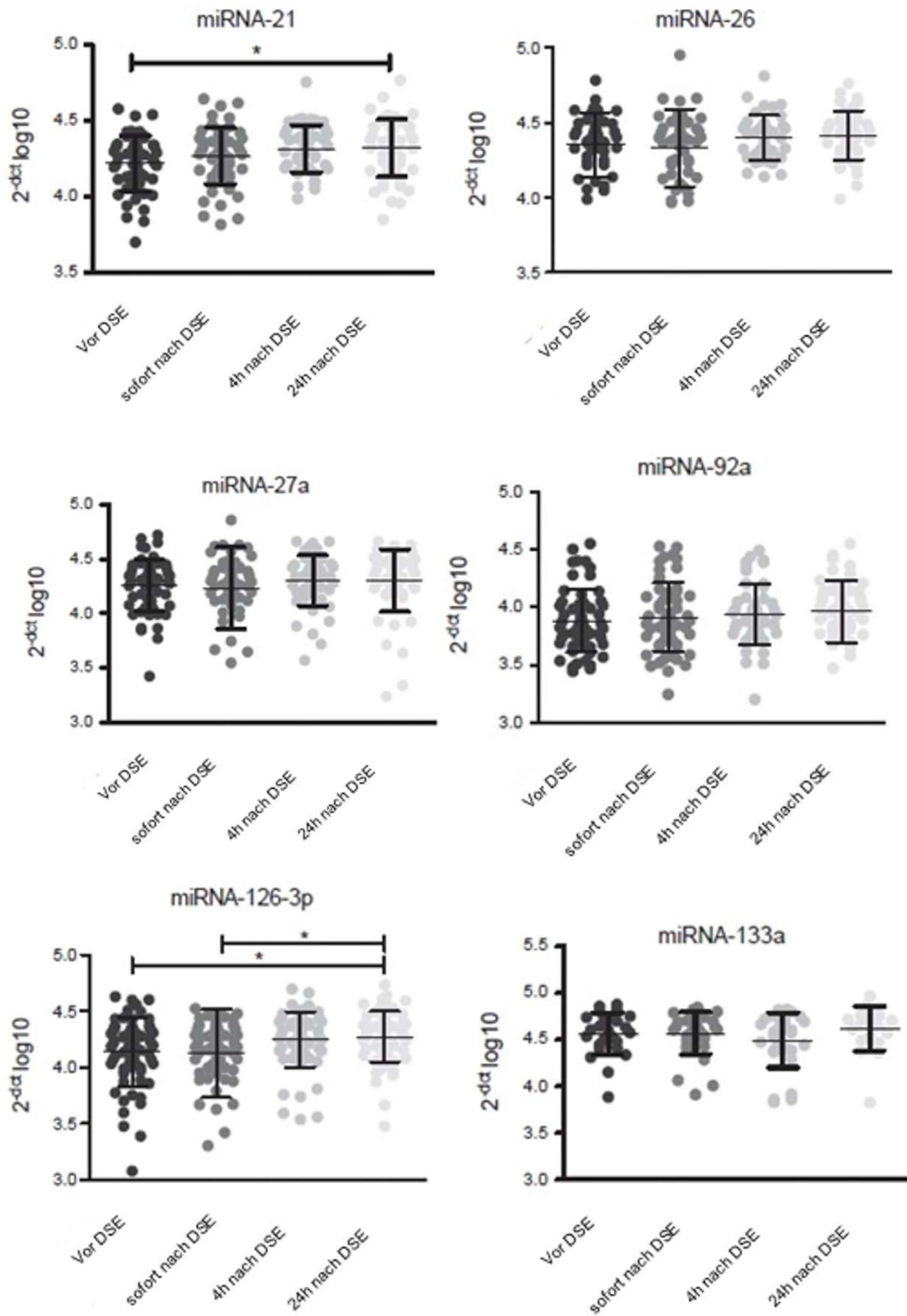
miRNA-199a-5p	4.54±0.29	4.57±0.20	4.48±0.39	0.26
miRNA-222	4.14±0.34	4.19±0.16	4.11±0.44	0.31
miRNA-223	3.93±0.28	3.95±0.04	3.86±0.05	0.18

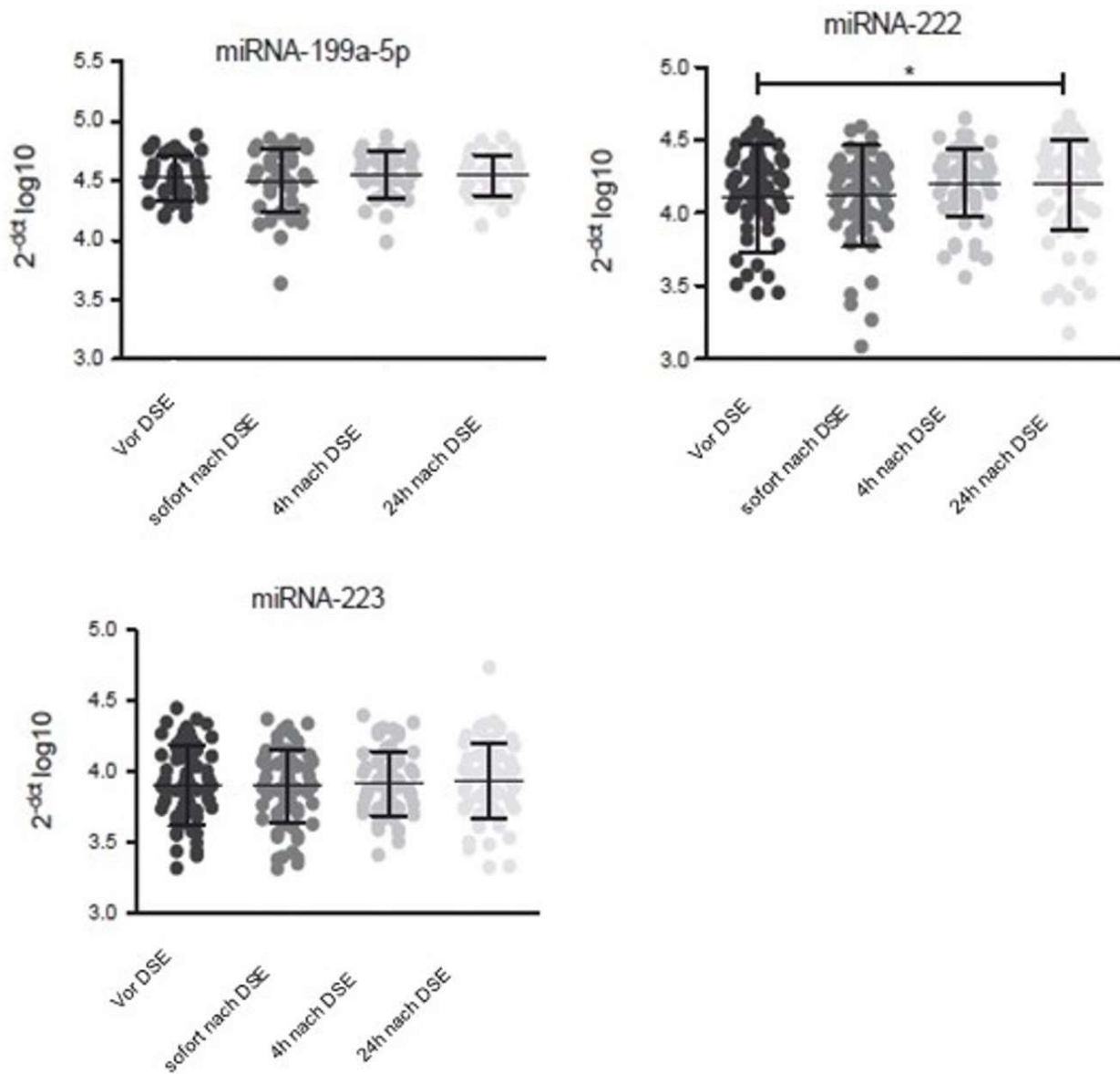
ARB=Angiotensin1- Rezeptor- Blocker; COPD=chronisch obstruktive Lungenerkrankung; DSE=Dobutamin-Stressechokardiographie; EF= Ejektionsfraktion; PCI=perkutane koronare Intervention

### 3.2 Zirkulierende miRNAs als Antwort auf kardialen Stress

Vorübergehende koronare Ischämie beeinträchtigt lokal und systemisch die Endothelfunktion in den Gefäßen und die myokardiale Sauerstoffversorgung. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass miRNAs bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit reguliert werden und ein großes Potential als diagnostische und prognostische Biomarker bieten (Fichtlscherer et al., 2011; Fichtlscherer et al., 2010; Jansen et al., 2014; Karakas et al., 2017). Um herauszufinden, ob zirkulierende miRNAs als Reaktion auf kardialen Stress gezielt in den Kreislauf freigesetzt werden, wurden in dieser Studie die Blutwerte für neun ausgewählte miRNAs sofort nach einer Dobutamin-Stressechokardiographie sowie vier und 24 Stunden nach der Untersuchung bestimmt. Bezüglich der verwendeten miRNAs konnte in vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass sie an unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgängen im kardiovaskulären System beteiligt zu sein scheinen. Der durch die Dobutamin-Stressechokardiographie hervorgerufene kardiale Stress führte zu signifikant erhöhten Plasma-Spiegeln von miRNA-21, miRNA-126-3p und miRNA-222 24 Stunden nach der Untersuchung. Die übrigen analysierten miRNAs zeigten keine signifikanten Veränderungen nach kardialen Stress.

## Zirkulierende miRNAs bei allen Patienten





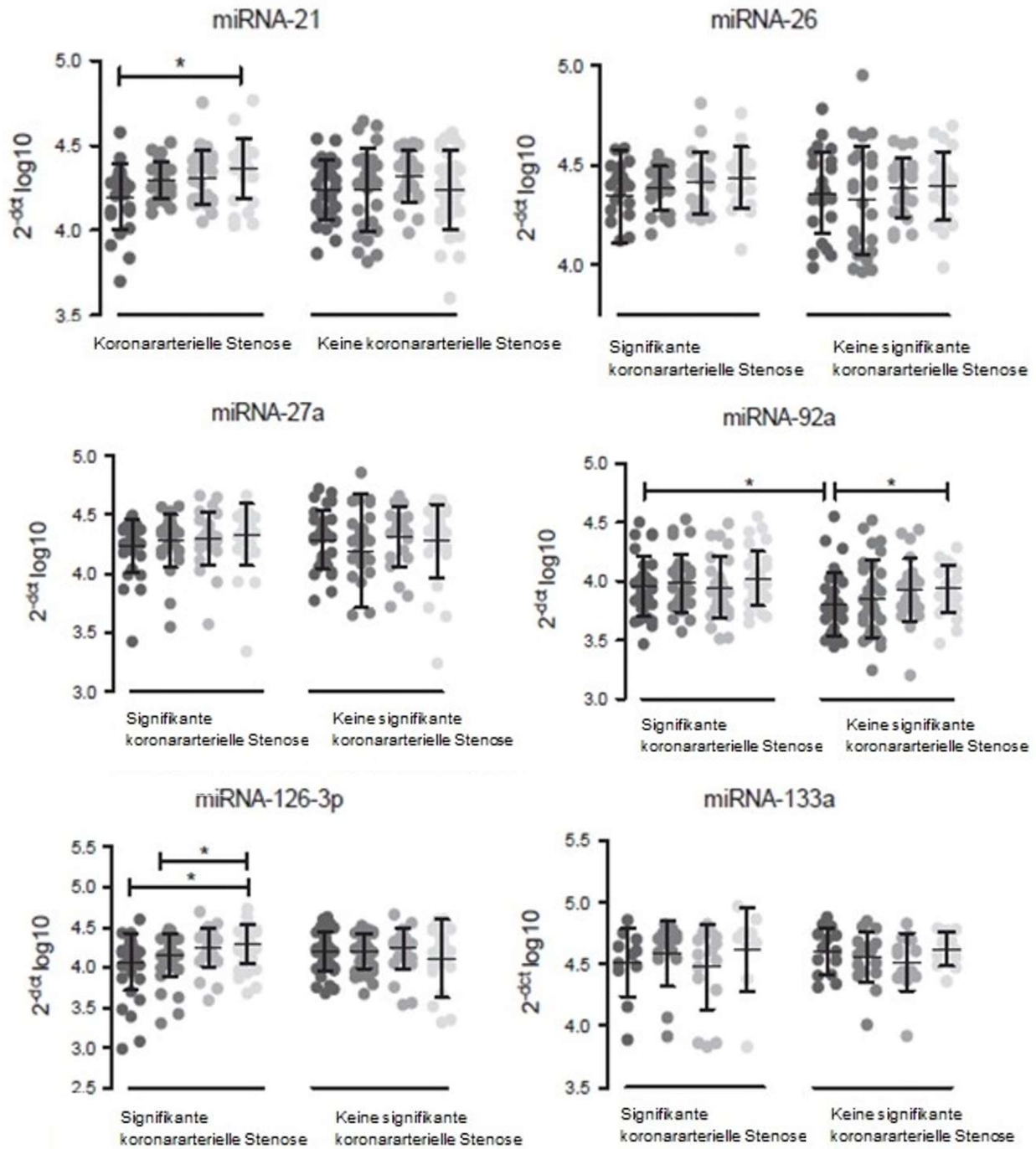
**Abb. 6:** Freisetzungskinetik zirkulierender miRNAs bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit als Reaktion auf kardialen Stress. Die Plasma miRNA-Spiegel wurden vor, direkt nach sowie vier und 24 Stunden nach der Dobutamin-Stressechokardiographie analysiert. Die Delta Ct Methode wurde verwendet, um die jeweilige miRNA-Expression zu quantifizieren. Die Werte wurden anhand der Messergebnisse für cel-miRNA-39 genormt und werden als  $2^{-[\text{Ct}(\text{miRNA})-\text{Ct}(\text{cel-miRNA-39})]}$   $\log_{10}$  ausgedrückt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \* $P < 0.05$ , nach der univariaten ANOVA mit Bonferronis Korrektur zum mehrfachen Vergleich.

### 3.3 Stratifizierung der zirkulierenden miRNAs in Bezug auf das Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose

Um herauszufinden, ob kardiale Ischämie, die bei Patienten mit einer signifikanten koronararteriellen Stenose durch kardialen Stress ausgelöst wird, zu einer selektiven Ausschüttung von miRNAs führt, stratifizierten wir die Patienten anhand des Vorliegens einer solchen Stenose. Bei 41 der eingeschlossenen 80 Patienten zeigte sich in der quantitativen Koronarangiographie eine signifikante koronararterielle Stenose, die restlichen 39 Patienten wiesen keine signifikante Stenose auf.

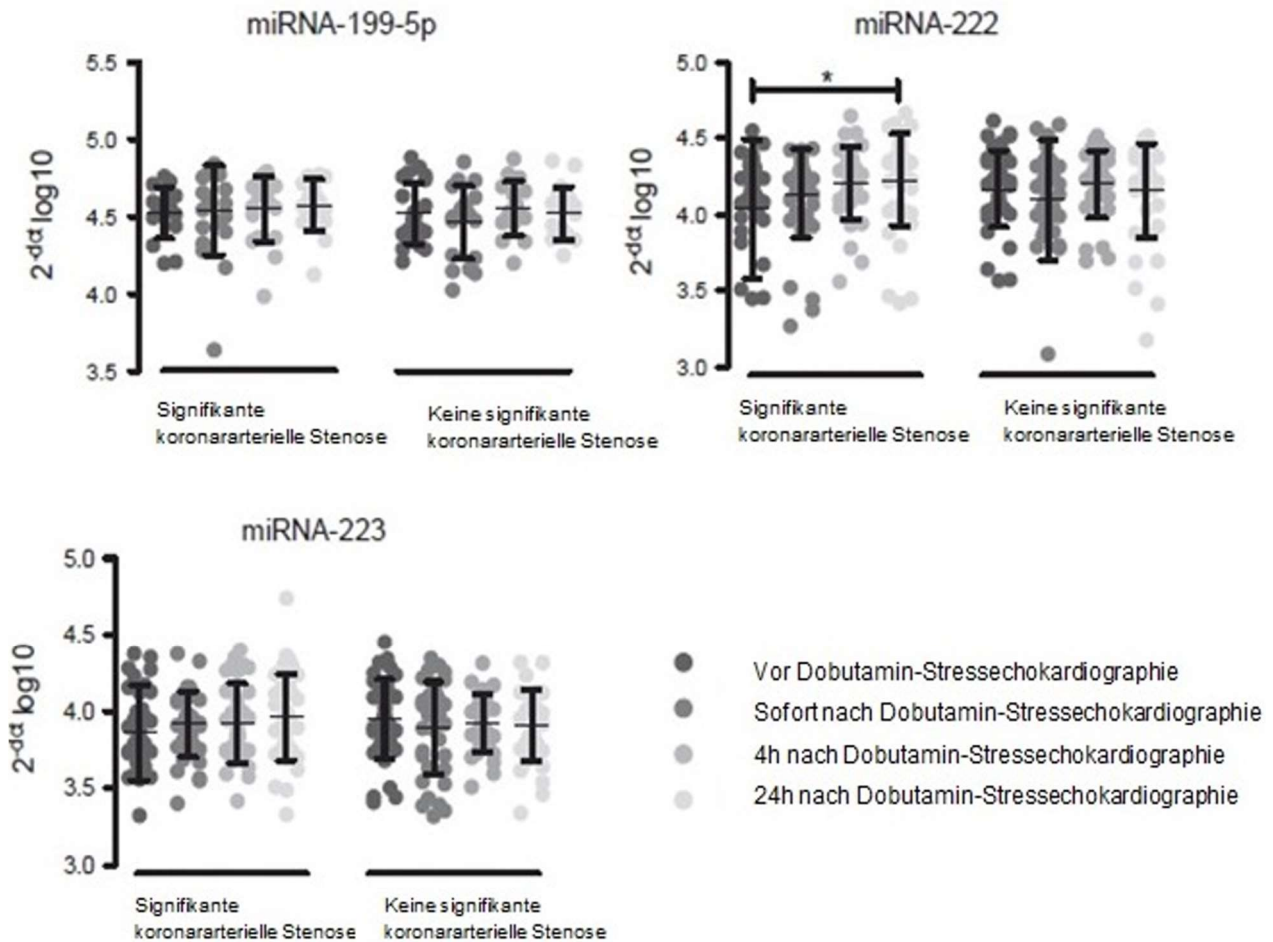
Diejenigen Patienten mit einer signifikanten koronararteriellen Stenose zeigten 24 Stunden nach der Stressechokardiographie einen signifikanten Anstieg der Plasmaspiegel zirkulierender miRNA-21, miRNA-126-3p und miRNA-222 als Antwort auf den kardialen Stress im Vergleich zu den Ausgangswerten. Bei den weiteren analysierten miRNAs konnten wir bei den Patienten mit signifikanter Stenose keine Regulation als Antwort auf kardialen Stress erkennen. Die Patienten ohne eine signifikante koronararterielle Stenose zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg zirkulierender miRNA-92a 24 Stunden nach der Stressechokardiographie. Die Regulation der übrigen miRNAs blieb bei diesen Patienten durch den kardialen Stress unbeeinflusst. Bei den jeweiligen Blutabnahmen, vor und sofort nach der Dobutamin-Stressechokardiographie sowie vier und 24 Stunden später, wurde zusätzlich der Troponin T Plasmaspiegel bestimmt. In der Auswertung zeigte sich zu keinem der Zeitpunkte eine signifikante Korrelation zwischen den miRNA-Plasmaspiegel und Troponin T.

Stratifizierung der miRNAs anhand des Vorliegens einer signifikanten koronararteriellen Stenose



- Vor Dobutamin-Stressechokardiographie
- Sofort nach Dobutamin-Stressechokardiographie
- 4h nach Dobutamin-Stressechokardiographie
- 24h nach Dobutamin-Stressechokardiographie





**Abb. 7:** Freisetzungskinetik zirkulierender miRNAs bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten koronarerteriellen Stenose. Die Plasma miRNA-Spiegel wurden vor, direkt nach sowie vier und 24 Stunden nach der Dobutamin-Stressechokardiographie analysiert. Die Delta Ct Methode wurde verwendet, um die jeweilige miRNA-Expression zu quantifizieren. Die Werte wurden anhand der Ergebnisse für cel-miRNA-39 genormt und werden als  $2^{-[Ct(miRNA)-Ct(ceI-miRNA-39)]} \log_{10}$  ausgedrückt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \* $P < 0.05$ , nach der univariaten ANOVA mit Bonferronis Korrektur zum mehrfachen Vergleich.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Hauptergebnisse

MiRNAs sind einflussreiche Regulatoren verschiedener (patho)physiologischer Prozesse bei kardiovaskulären Erkrankungen (Weber, 2013). Eine wachsende Anzahl von Studien zeigt, dass miRNAs im Blutkreislauf detektiert werden können und damit nützliche Biomarker bei Patienten mit kardiovaskulären Krankheitsbildern, wie der koronaren Herzkrankheit, darstellen.

Für die Diagnose des akuten Koronarsyndroms hat sich die Bestimmung des Biomarkers Troponin etabliert. Dieser ermöglicht es, zwischen einem Nicht-ST-Hebungsinfarkt und der instabilen Angina pectoris zu differenzieren und damit die Indikation für eine Koronarangiographie zu stellen (Hamm et al., 2011). Nach unserem Wissen gibt es bisher keinen Biomarker, um das Vorliegen einer signifikanten Stenose bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit zu detektieren. Anhand nicht-invasiver Tests und einer anschließenden Risikostratifikation wird entschieden, welcher Patient von einer Herzkatheteruntersuchung mit der Möglichkeit der Revaskularisierung profitieren könnte (Montalescot et al., 2013). Dabei weist jedoch nur ein Teil der Patienten eine revaskularisierungsbedürftige Stenose auf (Fleck und Hamm, 2016). Ob in diesem Fall das Expressionsmuster zirkulierender miRNAs nützlich sein könnte, um bei Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit und entsprechender Symptomatik eine Aussage über das Vorliegen einer signifikanten koronaren Stenose zu ermöglichen, ist unbekannt.

In dieser Arbeit erbrachten wir den Beweis, dass kardialer Stress, ausgelöst durch Dobutamingabe, bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit zur Freisetzung von vaskulären und myokardialen miRNAs in die Blutbahn führt. Außerdem war die Freisetzungskinetik der miRNAs als Antwort auf den kardialen Stress abhängig von dem Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose und daraus folgender koronarer Ischämie. So zeigten in unserer Studie Patienten mit einer signifikanten Stenose einen Anstieg der zirkulierenden miRNA-21, miRNA-126-3p und miRNA-222 Plasmaspiegel nach kardialem Stress.

In den letzten Jahren hat eine bemerkenswerte Anzahl an Studien die diagnostischen und prognostischen Möglichkeiten von zirkulierenden miRNAs bei Patienten mit

koronarer Herzkrankheit untersucht. In einer der ersten dieser Studien zeigten Fichtlscherer et al. (2010), dass miRNA-126, miRNA-17, miRNA-92a und die mit Entzündung assoziierte miRNA-155 signifikant vermindert waren bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu den Probanden in der gesunden Kontrollgruppe. Weiterhin waren die Werte für miRNA-133, miRNA-134, miRNA-145, miRNA-122 und miRNA-370 bei den an koronarer Herzkrankheit erkrankten Patienten verändert, auch nach Berücksichtigung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren (Navickas et al., 2016). Drei andere Studien, die das prognostische Potential zirkulierender miRNAs untersuchten, konnten zeigen, dass der Plasmaspiegel einer einzelnen miRNA oder die Analyse eines miRNA-Panels Aussagen über das kardiovaskuläre Outcome bei Patienten nach Myokardinfarkt ermöglicht (Zampetaki et al., 2012; Karakas et al., 2017; Bye et al., 2016). Zampetaki et al. (2012) konnten belegen, dass es möglich war, durch die Bestimmung der Plasmaspiegel von miRNA-126-3p und miRNA-223 die Mortalität in einer Kohorte von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit vorherzusagen. Unsere Studie ergänzt diese Datenlage, indem sie zeigen konnte, dass es anhand der Bestimmung eines miRNA-Panels, bestehend aus miRNA-21, miRNA-92a, miRNA-126-3p und miRNA-222, möglich war, zwischen Patienten mit und ohne signifikanter koronararterieller Stenose zu unterscheiden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Freisetzung dieser miRNAs in den Blutkreislauf abhängig von der koronararteriellen Perfusion ist. Verschiedene vorklinische Studien deckten auf, dass miRNAs von verschiedenen Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Vorwiegend für miRNA-126-3p wurde gezeigt, dass die miRNA von aktivierten oder apoptotischen Endothelzellen in Mikropartikeln oder apoptotischen Körpern verpackt und freigesetzt wird (Jansen et al., 2013; Zerneck et al., 2009; Jansen et al., 2017a). Die endotheliale Freisetzung von miRNA-126-3p ist jedoch reduziert, wenn atheroprotektiver laminarer Scherstress vorherrscht (Zhou et al., 2013). Passend zu unseren Daten zeigte eine klinische Studie kürzlich, dass miRNA-126-3p speziell in koronaren Blutgefäßen bei Patienten mit einem hohen Plaqueanteil oder verletzlichen Plaques freigesetzt wird (Leistner et al., 2016). MiRNA-222 wird vor allem von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (Liu et al., 2009; Jansen et al., 2015). Atherosklerotische Gefäßerkrankungen, wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder die koronare Herzkrankheit, sind mit einer

verminderten Anzahl von miRNA-222 im Blut verbunden (Jansen et al., 2015; Li et al., 2011). In vorherigen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass miRNA-222 die am stärksten regulierte miRNA zwischen Endothelzellen und Mikropartikeln war und die am zweithöchsten exprimierte miRNA in endothelialen Mikropartikeln nach miRNA-126-3p (Jansen et al., 2013). Dabei förderte der Transfer von miRNA-222 zu den endothelialen Zielzellen antiinflammatorische Effekte, indem sie dort die Expression von ICAM-1 hemmte (Jansen et al., 2015).

Ob der Anstieg der Plasmaspiegel von miRNA-126-3p, -222 und -21 nach kardialen Stress bei Patienten mit signifikanter koronararterieller Stenose das Ergebnis einer erhöhten lokalen koronararteriellen Freisetzung dieser miRNAs ist oder das einer systemischen Endothelaktivierung, ist unklar. Endothelzellen, die einen atherosklerotischen Plaque bedecken, der zu einer signifikanten Einengung einer Koronararterie führt, werden aktiviert und einer turbulenten Strömung ausgesetzt. Dies führt zur Freisetzung von entweder in Vesikel verpackten oder freien vaskulären miRNAs, wie zum Beispiel miRNA-126-3p und miRNA-222, in den Blutkreislauf. Da die vorübergehende koronare Ischämie ebenfalls systemisch die Gefäßendothelfunktion beeinflusst, könnten die erhöhten Werte für miRNA-126-3p und miRNA-222 nach kardialen Stress auch das Resultat einer systemischen Endothelaktivierung mit darauffolgender Freisetzung von vaskulären miRNAs sein.

Laut aktueller Studien spielt miRNA-21 eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Durch die Regulation des extrazellulär signalregulierten MAP (mitogen activated protein) Kinase-Signalwegs in kardialen Fibroblasten beeinflusst miRNA-21 die gesamte kardiale Struktur und Funktion (Thum et al., 2008). In einem Ischämie-Reperfusion-Modell aus Mäusen war miRNA-21 in der Infarktzone hochreguliert und löste den fibrotischen Umbau des Infarktareals aus, indem sie die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) hemmte (Roy et al., 2009). Die Ischämie-induzierte Hochregulierung von miRNA-21 könnte einen möglichen Mechanismus darstellen, der die erhöhten miRNA-21 Plasmaspiegel bei Patienten mit einer signifikanten Stenose und folgender kardialer Ischämie erklären könnte. Unsere Ergebnisse werden durch die Tatsache unterstützt, dass oszillatorischer Stress, wie er in Atherosklerose verdächtigen Arealen auftritt, die Aktivierung und Transkription von miRNA-21 fördert (Zhou et al., 2011).

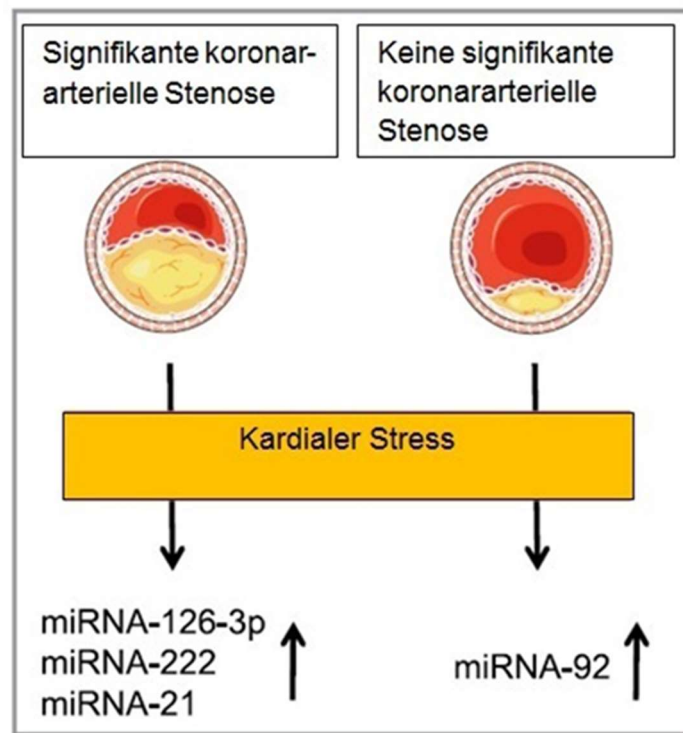
MiRNA-222 wird vor allem in der Gefäßwand, genauer in den Endothelzellen und den glatten Muskelzellen exprimiert (Jansen et al., 2014; Zerneck et al., 2009; Zhou et al., 2011). MiRNA-126-3p dagegen konnte in einer Vielzahl von Zellen entdeckt werden, darunter in Endothelzellen, Thrombozyten und Zellen, die dem Knochenmark entstammen (Willeit et al., 2013; Kaudewitz et al., 2016; Boer et al., 2013; Jakob et al., 2012; Mocharla et al., 2013). Im Gegensatz zu den selektiv exprimierten miRNAs, wird miRNA-21 in allen reifen, menschlichen Geweben, wie zum Beispiel dem Herzen, der Milz oder dem Dünn- und Dickdarm exprimiert (Sayed et al., 2008; Cheng und Zhang, 2010).

Obwohl diejenigen Patienten mit einer signifikanten koronararteriellen Stenose einen Anstieg der Plasmaspiegel von miRNA-21, miRNA-126-3p und miRNA-222 zeigten, entdeckten wir nur bei der Patientengruppe ohne relevante Stenose einen Anstieg der zirkulierenden miRNA-92a als Antwort auf kardialen Stress. Da niedrige Scherkräfte dort vorliegen, wo sich einengende Plaques befinden und turbulente Strömung herrscht, stimmen unsere Ergebnisse mit den experimentellen Studien überein, die demonstrieren, dass die Expression der pro-atherogenen endothelialen miRNA-92a durch niedrige Scherkräfte und den Kontakt mit oxidiertem LDL induziert wird (Loyer et al., 2014). Warum der Plasmaspiegel von miRNA-92a als Antwort auf kardialen Stress nur bei Patienten ohne eine signifikante Stenose ansteigt ist unklar. Angenommen, miRNA-92a begünstigt Atherogenese und vaskuläre Entzündung, so könnte man spekulieren, dass das Endothel von Patienten ohne signifikante koronararterielle Stenose schädliche miRNA-92a zum Selbstschutz freisetzt (Hinkel et al., 2013). Ein Mechanismus, der bei Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzkrankheit möglicherweise beeinträchtigt ist.

Unsere Studie zeigt, dass eher gefäßprotektive miRNAs, wie miRNA-126 und -222, bei Patienten mit kardialer Ischämie freigesetzt werden, wohingegen die eher gefäßschädigende miRNA-92a bei Patienten ohne signifikante Stenose als Antwort auf kardialen Stress reguliert wird. Wie auch einige andere miRNAs werden miRNA-126 und miRNA-92a direkt durch hämodynamische Belastung reguliert (Zampetaki und Mayr, 2012; Neth et al., 2013). Krüppel like factor 2 (KLF2), der einen Schlüsselfaktor für die Regulation der endothelialen Integrität darstellt, induziert die miRNA-126-, aber inhibiert die miRNA-92a-Expression (Wu et al., 2011). Veränderungen in der KLF2-Expression

oder anderer Regulatoren der miRNA-Biosynthese stellen möglicherweise Mechanismen dar, denen die unterschiedliche Freisetzungskinetik der zirkulierenden miRNAs als Antwort auf kardialen Stress, abhängig vom koronaren Status, zugrunde liegt.

Vorherige Studien haben den möglichen diagnostischen Stellenwert von zirkulierenden miRNAs bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit bereits zeigen können (Fichtlscherer et al., 2011). Unsere Studie ergänzt diese Ergebnisse, indem sie zeigen konnte, dass Patienten, die an koronarer Herzkrankheit erkrankt sind, in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten koronararterielle Stenose, auf kardialen Stress mit einem spezifischen Expressionsmuster von zirkulierenden miRNAs reagieren.



**Abb. 8:** Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse. Das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose beeinflusst das miRNA-Expressionsmuster als Reaktion auf kardialen Stress.

#### 4.2 Limitationen der Studie

Unsere Studie weist folgende Limitationen auf. Erstens wurde nur eine ausgewählte Anzahl von miRNAs, basierend auf publizierten Studien, analysiert. Somit wird

möglicherweise nur eine kleine Anzahl von allen regulierten miRNAs in der untersuchten Patientengruppe abgebildet. Zweitens wurde der miRNA-Plasmaspiegel nur bis zu 24 Stunden nach der Dobutamin-Stressechokardiographie gemessen. Eine Bestimmung der Expressionsmuster nach mehr als 24 Stunden im Anschluss an kardialen Stress könnte zusätzliche Informationen liefern, bezüglich der Freisetzungs- und Abbaukinetik der zirkulierenden miRNAs bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Drittens können wir nicht ausschließen, dass Ernährungsgewohnheiten und Tagesschwankungen Einfluss auf die gemessenen Spiegel hatten. Viertens wurde während der Koronarangiographie die fraktionelle Flussreserve nicht gemessen, um die hämodynamische Relevanz der koronaren Stenosen beurteilen zu können. Des Weiteren werden weitere Studien nötig sein, um die pathophysiologischen Ursachen und Auswirkungen der veränderten miRNA-Plasmaspiegel vollständig zu klären.

#### 4.3 Ausblick

Betrachtet man den Nutzen unserer Studie für den klinischen Alltag, so konnten wir zeigen, dass zirkulierende miRNAs möglicherweise hilfreiche Parameter sein könnten, um ergänzend zur bildgebenden, nicht-invasiven Diagnostik, den koronaren Status von Patienten mit koronarer Herzkrankheit besser zu differenzieren. Die Verwendung von miRNAs als Biomarker könnte es ermöglichen, schon vor einer invasiven Diagnostik zwischen Patienten mit einer signifikanten Stenose und denjenigen ohne einer solchen zu unterscheiden.

MiRNAs eignen sich aufgrund ihrer Stabilität und Gewebsspezifität gut als Biomarker. Ein routinemäßiger Einsatz dieser Biomarker in der Diagnostik der stabilen koronaren Herzkrankheit könnte in Zukunft die Vermeidung von unnötigen Herzkatheteruntersuchungen bei Patienten ohne eine signifikante intervenierungsbedürftige Stenose ermöglichen. 2015 wurden in Deutschland schätzungsweise 900.000 Herzkatheteruntersuchungen durchgeführt, bei denen nur in 40 % der Fälle eine perkutane Katheterintervention erfolgte. In 1,59 % der Untersuchungen traten, laut Herzbericht 2015, schwere klinische Ereignisse auf. Die Sterblichkeit im Krankenhaus bei einer isolierten Koronarangiographie lag bei 1,41 % (Fleck und Hamm, 2016). Perspektivisch könnte durch die Bestimmung zusätzlicher Biomarker vor einer geplanten invasiven Diagnostik, wie z.B. miRNAs, verhindert werden, dass Patienten den Risiken und

Komplikationen einer Koronarangiographie unnötig ausgesetzt werden. Der akute koronare Verschluss, die transitorische ischämische Attacke, Schlaganfall oder Tod zählen dabei zu den wichtigsten Komplikationen. Nebenbei verursacht die breite Anwendung der invasiven Eingriffe hohe Kosten im Gesundheitssystem (Löwel, 2006). Voraussetzung wäre jedoch, dass die zahlenmäßige Reduktion der invasiven Diagnostik zugunsten nicht-invasiver Diagnostik eine gleichbleibende diagnostische Sicherheit gewährleistet (Albus et al., 2017). Dafür müsste durch die Bestimmung etwaiger Biomarker eine sichere Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne signifikanter koronararterieller Stenose, bei vorliegender stabiler koronarer Herzkrankheit, garantiert werden. Des Weiteren müssten verlässliche sowie vergleichbare als auch einfache und kostengünstige Messmethoden entwickelt werden, die den Einsatz von miRNAs als Biomarker im klinischen Alltag erlauben würden (Bye et al., 2016).



## 5. Zusammenfassung

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf kardiovaskuläre Gesundheit und Krankheit, indem sie auf posttranskriptionaler Ebene die Genexpression regulieren. Da miRNAs auch in den Blutkreislauf freigesetzt werden, stellen sie potentielle neue Biomarker für zahlreiche Erkrankungen dar. In dieser Studie befassten wir uns mit der Frage, inwiefern miRNAs bei Patienten mit chronischer koronarer Herzkrankheit als Antwort auf kardialen Stress in den Blutkreislauf freigesetzt und reguliert werden und ob es möglich ist, anhand der Freisetzungskinetik Aussagen über das Vorliegen einer signifikanten Koronarstenose zu machen. 80 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und der bereits gestellten Indikation für eine Koronarangiographie wurden als Probanden in die Studie aufgenommen. Bei allen teilnehmenden Patienten wurde zunächst eine Dobutamin-Stressechokardiographie durchgeführt. Den Patienten wurde vor der Untersuchung, direkt danach sowie vier und 24 Stunden später venöses Blut entnommen. In jeder Probe wurden mittels Real-Time PCR die Plasmaspiegel von neun vaskulären miRNAs ermittelt: miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-27a, miRNA-92a, miRNA-126-3p, miRNA-133a, miRNA-199-5p, miRNA-222 und miRNA-223. In der anschließenden Koronarangiographie zeigte sich bei 41 der 80 Patienten eine signifikante Koronararterienstenose. Diejenigen Patienten mit Stenose wiesen in der Auswertung signifikant höhere Ausgangswerte für miRNA-92a in den Blutproben auf und einen signifikanten Anstieg der Plasmaspiegel von miRNA-21, miRNA-126-3p und miRNA-222 24 Stunden nach der Dobutamin-Stressechokardiographie verglichen mit den Ausgangswerten. Im Vergleich dazu zeigten die Patienten ohne signifikante koronararterielle Stenose einen signifikanten Anstieg für miRNA-92a 24 Stunden nach der Stressechokardiographie. Anhand dieser Studie, deren Ergebnisse von Jansen et al. (2017b) im Journal of the American Heart Association veröffentlicht worden sind, konnten wir zeigen, dass kardialer Stress zur Freisetzung von unterschiedlichen vaskulären und myokardialen miRNAs in die Blutbahn führt. Dabei war die Freisetzungskinetik der miRNAs abhängig von dem Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der miRNA-Quantifizierung	23
Abbildung 2: RNA-Isolation	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reversen Transkriptase	27
Abbildung 4: 96-Well PCR-Reaktionsplatte	30
Abbildung 5: Studienaufbau	33
Abbildung 6: Freisetzungskinetik zirkulierender miRNAs bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit als Reaktion auf kardialen Stress	37
Abbildung 7: Freisetzungskinetik zirkulierender miRNAs bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose	40
Abbildung 8: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse	46

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mastermix-Ansatz	28
Tabelle 2: Reverse Transkriptase Primer Verdünnungsschema	28
Tabelle 3: Mastercycler Programmierung	28
Tabelle 4: Reaktionsansatz je Genexpressionsprobe	29
Tabelle 5: Reaktionsansatz NTC (No template control)	29
Tabelle 6: Temperatur- und Zeiteinstellung für den Reaktionsablauf im Fast Real-Time PCR System	30
Tabelle 7: Baseline-Charakteristika in Abhängigkeit vom Vorliegen einer signifikanten koronararteriellen Stenose	34

## 8. Literaturverzeichnis

- Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 391: 73–77
- Albus C, Barkhausen J, Fleck E, Haasenritter J, Lindner O, Silber S, on behalf of the German National Disease Management Guideline "Chronic CHD" development group. Clinical practice guideline: The diagnosis of chronic coronary heart disease. *Dtsch Arztl Int* 2017; 114: 712–719
- Boer HC de, van Solingen C, Prins J, Duijs JMGJ, Huisman MV, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *European heart journal* 2013; 34: 3451–3457
- Busch MA, Kuhnert R. 12-Monats-Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2017; 2: 64–69
- Bye A, Røsjø H, Nauman J, Silva GJJ, Follestad T, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2016; 97: 162–168
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Circulation research* 2000; 87: 840–844
- Chapman MJ. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis. *Pharmacology & therapeutics* 2007; 113: 184–196
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 2005; 33: e179
- Chen W-J, Yin K, Zhao G-J, Fu Y-C, Tang C-K. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012; 222: 314–323
- Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *Journal of cardiovascular translational research* 2010; 3: 251–255
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Nature protocols* 2006; 1: 581–585
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation. Cardiovascular genetics* 2010; 3: 499–506

Daniel J-M, Penzkofer D, Teske R, Dutzmann J, Koch A, Bielenberg W, Bonauer A, Boon RA, Fischer A, Bauersachs J, van Rooij E, Dimmeler S, Sedding DG. Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury. *Cardiovascular research* 2014; 103: 564–572

Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair M-L, Heymans S, Wagner DR. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clinical chemistry* 2012; 58: 559–567

Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann W-K, Zeiher AM, Dimmeler S. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 2010; 115: 4944–4950

Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 2012; 492: 376–381

Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation research* 2016; 118: 703–720

Fichtlscherer S, Rosa S de, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research* 2010; 107: 677–684

Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; 31: 2383–2390

Fleck E, Hamm C. *Deutscher Herzbericht 2016*. Deutsche Herzstiftung e.V., Reg., Hrsg. 2016

Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. Robert Koch-Institut (RKI), Reg., Hrsg. 2015

Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circulation. Cardiovascular genetics* 2010; 3: 484–488

Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European heart journal* 2011; 32: 2999–3054

Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer. *Trends in molecular medicine* 2014; 20: 460–469

Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu Q-F, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation* 2013; 128: 1066–1075

Icli B, Dorbala P, Feinberg MW. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* 2014; 24: 241–248

Jakob P, Doerries C, Briand S, Mocharla P, Kränkel N, Besler C, Mueller M, Manes C, Templin C, Baltes C, Rudin M, Adams H, Wolfrum M, Noll G, Ruschitzka F, Lüscher TF, Landmesser U. Loss of angiomiR-126 and 130a in angiogenic early outgrowth cells from patients with chronic heart failure. *Circulation* 2012; 126: 2962–2975

Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease. *Circulation research* 2017a; 120: 1649–1657

Jansen F, Schäfer L, Wang H, Schmitz T, Flender A, Schueler R, Hammerstingl C, Nickenig G, Sinning J-M, Werner N. Kinetics of Circulating MicroRNAs in Response to Cardiac Stress in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American Heart Association* 2017b; 6: e005270

Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, Paul K, Alhusseiny A, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *Journal of cellular and molecular medicine* 2015; 19: 2202–2214

Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* 2013; 128: 2026–2038

Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning J-M, Vasa-Nicotera M, Nickenig G, Werner N. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Journal of the American Heart Association* 2014; 3: e001249

Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Münzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study. *European heart journal* 2017; 38: 516–523

Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, Sunderland NP, Willeit K, Morton AC, Armstrong PC, Chan MV, Lu R, Yin X, Gracio F, Dudek K, Langley SR, Zampetaki A, Rinaldis E de, Ye S, Warner TD, Saxena A, Kiechl S, Storey RF, Mayr M. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circulation research* 2016; 118: 420–432

- Kloosterman WP, Plasterk RHA. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell* 2006; 11: 441–450
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)* 2001; 294: 853–858
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854
- Leistner DM, Boeckel J-N, Reis SM, Thome CE, Rosa R de, Keller T, Palapies L, Fichtlscherer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics. *European heart journal* 2016; 37: 1738–1749
- Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. *Clinical biochemistry* 2012; 45: 727–732
- Li T, Cao H, Zhuang J, Wan J, Guan M, Yu B, Li X, Zhang W. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2011; 412: 66–70
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–1143
- Liebetrau C, Möllmann H, Dörr O, Szardien S, Troidl C, Willmer M, Voss S, Gaede L, Rixe J, Rolf A, Hamm C, Nef H. Release kinetics of circulating muscle-enriched microRNAs in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: 992–998
- Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circulation research* 2009; 104: 476–487
- Löwel H. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. Robert-Koch-Institut, Reg., Hrsg. 2006
- Loyer X, Potteaux S, Vion A-C, Guérin CL, Boulkroun S, Rautou P-E, Ramkhalawon B, Esposito B, Dalloz M, Paul J-L, Julia P, Maccario J, Boulanger CM, Mallat Z, Tedgui A. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circulation research* 2014; 114: 434–443
- Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA. *Current genomics* 2010; 11: 537–561
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 10513–10518

Mocharla P, Briand S, Giannotti G, Dörries C, Jakob P, Paneni F, Lüscher T, Landmesser U. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMCs. *Blood* 2013; 121: 226–236

Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot J-S, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabaté M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJM, Zamorano JL, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Valgimigli M, Claeys MJ, Donner-Banzhoff N, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Husted S, James SK, Kervinen K, Kristensen SD, Maggioni AP, Pries AR, Romeo F, Rydén L, Simoons ML, Steg PG, Timmis A, Yildirim A. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European heart journal* 2013; 34: 2949–3003

Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011; 145: 341–355

Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparuskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease. *Cardiovascular research* 2016; 111: 322–337

Neth P, Nazari-Jahantigh M, Schober A, Weber C. MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling. *Cardiovascular research* 2013; 99: 294–303

Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circulation research* 2009; 104: 879–886

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *The New England journal of medicine* 1986; 314: 488–500

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 1999; 340: 115–126

Roy S, Khanna S, Hussain S-RA, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction. *Cardiovascular research* 2009; 82: 21–29

Sayed D, Rane S, Lypowy J, He M, Chen I-Y, Vashistha H, Yan L, Malhotra A, Vatner D, Abdellatif M. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Molecular biology of the cell* 2008; 19: 3272–3282

Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, Hartmann T, Lackner KJ, Westermann D, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. miRNA-197 and miRNA-223



Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PloS one* 2015; 10: e0145930

Shan Z, Qin S, Li W, Wu W, Yang J, Chu M, Li X, Huo Y, Schaer GL, Wang S, Zhang C. An Endocrine Genetic Signal Between Blood Cells and Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65: 2526–2537

Shatseva T, Lee DY, Deng Z, Yang BB. MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. *Journal of cell science* 2011; 124: 2826–2836

Sicari R, Nihoyannopoulos P, Evangelista A, Kasprzak J, Lancellotti P, Poldermans D, Voigt J-U, Zamorano JL. Stress echocardiography expert consensus statement. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* 2008; 9: 415–437

Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336–342

Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt (Destatis), Reg., Hrsg. 2017

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980–984

Urbich C, Kaluza D, Frömel T, Knau A, Bennewitz K, Boon RA, Bonauer A, Doebele C, Boeckel J-N, Hergenreider E, Zeiher AM, Kroll J, Fleming I, Dimmeler S. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood* 2012; 119: 1607–1616

Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular research* 2008; 79: 581–588

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education* 2005; 29: 151–159

van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117: 2369–2376

Weber C. MicroRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013; 33: 168–169

Weber C, Noels H. Atherosclerosis. *Nature medicine* 2011; 17: 1410–1422

Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A. MicroRNA-126, -145, and -155. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013; 33: 449–454

Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, Warner TD, Kiechl S, Mayr M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circulation research* 2013; 112: 595–600

Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet J-P, Cremer J, Falk V, Filippatos G, Hamm C, Head SJ, Jüni P, Kappetein AP, Kastrati A, Knuuti J, Landmesser U, Laufer G, Neumann F-J, Richter DJ, Schauerte P, Sousa Uva M, Stefanini GG, Taggart DP, Torracca L, Valgimigli M, Wijns W, Witkowski A. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European heart journal* 2014; 35: 2541–2619

Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, Villarreal G, Wang K-C, Geary GG, Zhang Y, Wang W-C, Huang H-D, Zhou J, Li Y-S, Chien S, Garcia-Cardena G, Shyy JY-J. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation* 2011; 124: 633–641

Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149: 251–266

Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research* 2010; 107: 810–817

Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circulation research* 2012; 110: 508–522

Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard J-M, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60: 290–299

Zeller T, Keller T, Ojeda F, Reichlin T, Twerenbold R, Tzikas S, Wild PS, Reiter M, Czyz E, Lackner KJ, Munzel T, Mueller C, Blankenberg S. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *European heart journal* 2014; 35: 2106–2114

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling* 2009; 2: ra81

Zhang S, Liu L, Wang R, Tuo H, Guo Y, Yi L, Wang J, Wang D. MiR-199a-5p promotes migration and tube formation of human cytomegalovirus-infected endothelial cells through downregulation of SIRT1 and eNOS. *Archives of virology* 2013; 158: 2443–2452

Zhou J, Li Y-S, Nguyen P, Wang K-C, Weiss A, Kuo Y-C, Chiu J-J, Shyy JY, Chien S. Regulation of vascular smooth muscle cell turnover by endothelial cell-secreted microRNA-126. *Circulation research* 2013; 113: 40–51

Zhou J, Wang K-C, Wu W, Subramaniam S, Shyy JY-J, Chiu J-J, Li JY-S, Chien S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor-alpha in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 10355–10360

## 9. Danksagung

Zu aller erst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Felix Jansen für die Bereitstellung des Themas und vor allem für seine hervorragende Betreuung und Hilfe während der gesamten Zeit danken. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Jan-Malte Sinning für die Bereitstellung der Proben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dem ganzen Laborteam, insbesondere Anna und Theresa, danke ich für die gute Unterstützung bei der Laborarbeit und für die unterhaltsamen Stunden währenddessen. Ein großer Dank geht an Peter, der mich immer wieder motiviert hat, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, Mama, Papa und Katerina, auf deren Rückhalt ich mich immer verlassen kann.